

Année 1967

N° d'ordre : 439

THÈSES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Roger DURAND

PREMIERE THESE

Oxydation du glutamate au niveau des sarcosomes de cœur de Porc

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le - **3 JUIN** 1967, devant la Commission d'Examen.

MM. J. CHOPIN	Président
M ^{lle} D. GAUTHERON	} Examineurs
MM. L. COLOBERT	

LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1967

Année 1967

N° d'ordre : 439

THÈSES

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LYON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Roger DURAND

PREMIERE THESE

Oxydation du glutamate au niveau des sarcosomes de cœur de Porc

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le

1967, devant la Commission d'Examen.

MM. J. CHOPIN

Président

M^{lle} D. GAUTHERON

MM. L. COLOBERT

} Examineurs

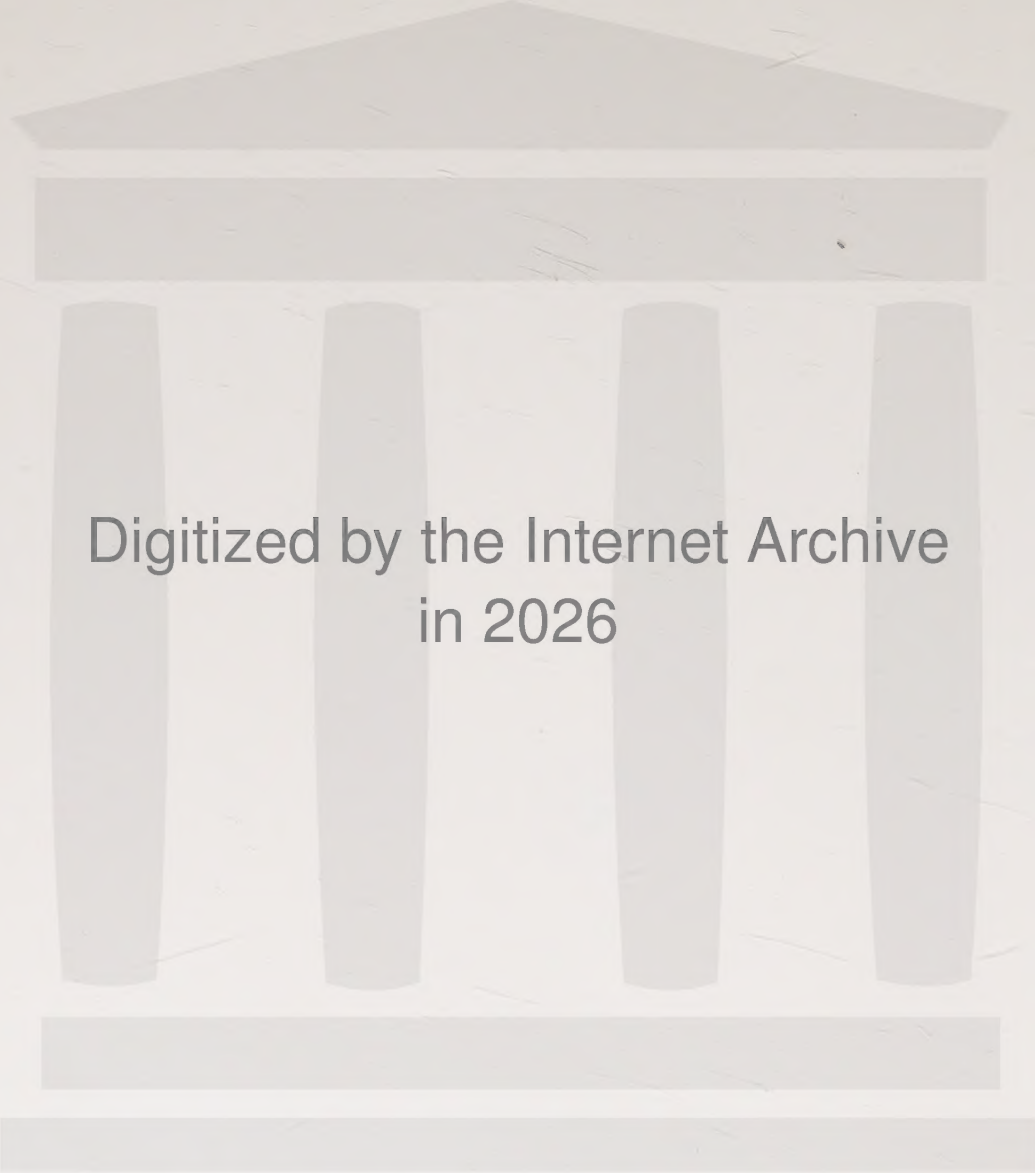
LYON

Imprimerie BOSC Frères
42, quai Gailleton, 42

1967



Thèse préparée au laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lyon
sous la direction de D. GAUTHERON, Professeur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552601_0017

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET, DUFAY Jean.

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. MESNARD
BOIDIN

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie
PRETTRE	Chimie Industrielle
COURTY	Chimie-Physique
KUHNER	Botanique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée
PARIS	Chimie minérale
AUMERAS	Chimie générale II
JANIN	Physique générale
FLANDRIN	Géologie appliquée
BERNARD	Physique industrielle
NIGON	Zoologie expérimentale
GAUTHIER Henri	Géologie générale
WAUTIER	Zoologie
CHOPIN	Chimie biologique
CUEILLERON	Chimie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée
SARAZIN	Physique nucléaire
BOIDIN	Microbiologie et Mycologie
PERES	Physiologie
MESNARD	Electronique
GRANDMONTAGNE	Physique
BOUTILLIER	Minéralogie
LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
DREUX	Chimie organique
TEICHNER	Chimie industrielle
PAVANS de CECCATTY	Zoologie
MERLIN	Chimie analytique
DUFAY Maurice	Physique de l'atmosphère
PHILBERT	Physique nucléaire

MM. COHEN-ADAD
DAVID Louis
CHANEL
MAURY

Chimie
Géologie générale
Psychophysiologie
Méthodes mathématiques de la physi-
que

DEPRAZ
GAUTHIER Jean
GAUME
UZAN
LEGAY
LAFORGUE
GERMAIN
CHENEVOY
BIGAY

Physique nucléaire
Chimie
Physique expérimentale
Physique
Biologie animale
Physique
Chimie
Géologie appliquée
Astronomie

Professeurs sans chaire

FERON
GINET
ASCH
MICHEL Pierre
Mlle MAITROT
GEVIN
PONASSE
d'INCAN
LEFEBVRE
PERNET
CHERY
BERGEON
Mlle GAUTHERON
DESCOTES
ERBEIA
Mme ERICSON
LEMOIGNE
MARTEL
MATHIEU
MICHEL Georges
PICARD Philippe
LEBRETON
TOUSSET

Mathématiques
Zoologie
Physique
Minéralogie
Physique
Géologie générale
Mathématiques
Physique C. S. U.
Mathématiques
Mathématiques
Physique
Physique C. S. U.
Chimie biologique
Chimie organique
Physique
Physique générale
Botanique
Mécanique
Mécanique des fluides
Biochimie
Mathématiques
Biologie végétale
Chimie propédeutique

Maîtres de Conférences

MM. DEMARCQ
DAVID Jean
FEUVRAIS
SCHMITT
LAURENT
ROT

Géologie générale
Biologie animale
Physique-Electricité
Physique C. P. E. M.
Chimie organique
Mathématiques

	BETHOUX	Mathématiques T. M. P.
Mele	CALAIS	Mathématiques
	GUSAKOW	Physique
Mle	THOMAS	Chimie minérale
	AUBIN	Analyse numérique
	BUCHWALTER	Mathématiques
	BOUZON	Mathématiques C. S. U.
	COSNIER	Psychophysiologie
Mle	LAMOURE	Biologie végétale
	PORTHAULT	Chimie C. S. U.
	VALLET	Chimie macromoléculaire
	HAUGAZEAU	Analyse numérique
	ENAY	Géologie
	BERTHET	Biologie végétale C. P. E. M.
	BRUN	Biologie animale
	DELMAU	Physique
	EL BAZ	Physique - Electricité
	FONTANGES	Physiologie
	HUET	Chimie C. P. E. M.

Maître de Conférence Adjoint

M. PIERRON Chimie

Conseiller Administratif

M. BURNET

Secrétaire Principal honoraire

M. ROUX

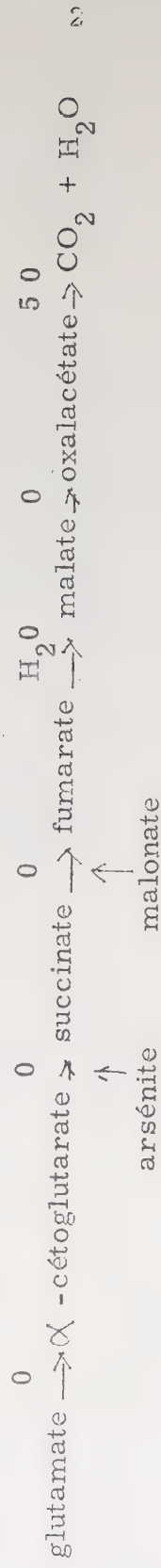
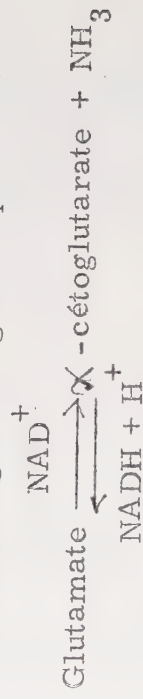
Une expérience n'est rien d'autre qu'une question posée à la nature, la mesure, le relevé de la réponse. Mais avant d'effectuer l'expérience, on doit la penser, c'est-à-dire formuler la question que l'on entend adresser à la nature, et avant de tirer une conclusion de la mesure, on doit l'interpréter, c'est-à-dire comprendre la réponse de la nature.

Max PLANCK

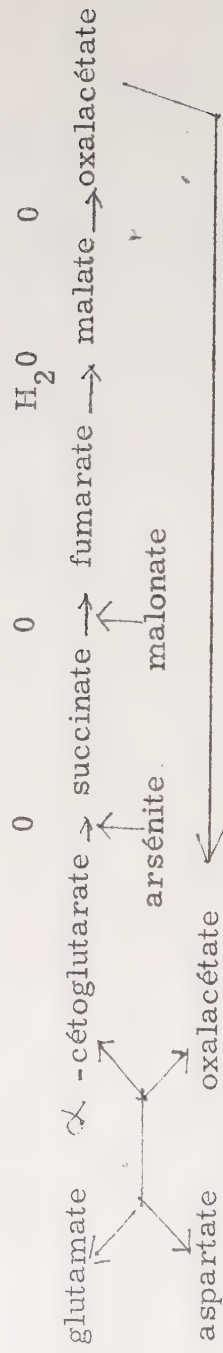
(extrait de : "L'Image du monde dans la
Physique moderne" -
cité par A. Regnier dans "Les infortu-
nes de la raison"
Seuil éd. 1966)

Voies d'oxydation du GLUTAMATE dans les sarcosomes.

1^{ère} Voie - Déshydrogénase glutamique directe



2^{ème} Voie - Oxydation après transamination



INTRODUCTION

Jusqu'en 1950, il était tacitement admis que le glutamate s'oxydait, dans les tissus des mammifères, essentiellement par la déshydrogénase glutamique (schéma 1, voie 1).

A cette époque, MULLER et LEUTHARDT (60) montrèrent que ce substrat peut s'oxyder, dans les mitochondries de foie, par transamination avec l'oxalacétate. Il se forme alors de l'aspartate et de l' α -cétoglutarate qui est réoxydé par la voie habituelle du cycle de KREBS (schéma 1, voie 2).

De même, D. GAUTHERON et Y. GAUDEMER (25) constatèrent, au cours d'une étude comparative des phosphorylations oxydatives au niveau des sarcosomes de muscle utérin et cardiaque de Porc, que l'oxydation du glutamate, dans ces particules, se fait presque exclusivement par transamination. Le malonate (inhibiteur de la déshydrogénase succinique) inhibe, en effet, le QO_2 à 97 % dans le coeur et de 77 à 95 % dans l'utérus ; une inhibition presque totale de la formation d'aspartate est observée. D'autres auteurs mirent l'accent sur l'importance de la transamination dans des broyats de tissus ou avec d'autres mitochondries (7) (8) (42) (48).

Toutefois, quelques faits nous suggérèrent que, dans le cas des sarcosomes de coeur de Porc, la déshydrogénase glutamique peut jouer un rôle plus important que ne l'avaient laissé prévoir les résultats obtenus avec le malonate ; notamment, son fonctionnement peut dépendre de la disponibilité en NAD^+ .

Au moment où débuta notre travail (1961) l'existence de cet enzyme dans les sarcosomes de coeur était discuté et son rôle éventuel sous estimé par les chercheurs intéressés.

Ceci nous a conduit à étudier en détail les facteurs qui contrôlent l'oxydation du glutamate par l'une ou l'autre des deux voies.

En effet, l'importance de la déshydrogénase glutamique doit être considérée sous l'angle du rôle régulateur que cet enzyme peut jouer dans le métabolisme de la mitochondrie. Ce rôle régulateur est lié à la position de l'enzyme à la jonction du métabolisme des hydrates de carbone et des acides aminés. Selon le contexte métabolique, l'enzyme fonctionne dans le sens de l'oxydation du glutamate ou dans celui de la réduction de l' α -cétooglutarate, ou ne fonctionne pas du tout.

De plus, les résultats obtenus avec la déshydrogénase glutamique isolée du foie de boeuf, mettent en relief la grande sensibilité de ce type de protéine à une régulation allostérique, telle que l'ont définie J. MONOD et coll. (59). Parmi les effecteurs allostériques citons : l'ADP qui active l'enzyme dans le sens de l'oxydation du glutamate (51), le GTP qui l'inhibe dans le même sens (24) et active la déshydrogénation de l'alanine par le même enzyme (77). Il n'est pas impossible que l'enzyme, dans le cas du coeur de Porc, puisse aussi présenter de telles propriétés.

Après un rappel théorique concernant les propriétés des mitochondries en rapport avec notre travail, nous décrirons dans un premier chapitre les techniques employées et le matériel utilisé.

Dans un second chapitre, nous montrerons l'influence de l'addition de NAD^+ et de différents facteurs sur l'oxydation du glutamate.

Nous apporterons les preuves directes de l'existence de la déshydrogénase glutamique et de son fonctionnement dans le troisième chapitre. Un ensemble de résultats, inclus dans ce chapitre, permettra de préciser la spécificité et la localisation de l'enzyme.

Le quatrième chapitre sera consacré à la présentation de bilans complets de l'oxydation du glutamate dans différentes conditions. Des bilans comparatifs, dans les mêmes conditions, seront donnés pour les mitochondries de foie de rat.

Enfin, nous tirerons les conclusions de notre travail et discuterons nos résultats.

Rappel théorique concernant les propriétés des mitochondries^x

LA MISE EN RESERVE DE L'ENERGIE PAR LES ÊTRES VIVANTS

Elle s'effectue principalement sous forme d'ATP. Pour ce faire, les êtres vivants utilisent les systèmes multienzymatiques de la glycolyse, des phosphorylations oxydatives et des photophosphorylations. Ces systèmes sont largement distribués et ne s'excluent pas forcément l'un l'autre. Les cellules animales utilisent l'ATP provenant généralement de la glycolyse et des phosphorylations oxydatives, les cellules végétales, dans les cas les plus favorables, celui provenant des trois systèmes.

Selon RACKER (68), l'ensemble des réactions de synthèse de l'ATP obéit à 4 mécanismes biochimiques : les phosphorylations liées à l'oxydation d'un substrat comme celle liée à l'oxydation de la 3-phosphoglyceraldéhyde, les réactions liées à la coupure phosphorolytique de liaisons - C - C -, - C - N =, - C - S -, la déshydratation du 2-phosphoglycérate et les réactions liées à un transfert d'électrons (phosphorylation oxydative et photophosphorylation).

Les trois premiers types de synthèse d'ATP sont catalysés par des enzymes solubilisés dans le cytoplasme, le dernier, par des systèmes particulés : mitochondries et chloroplastes. Il faut toutefois préciser que la synthèse d'ATP liée à la transformation du succinyl CoA (E.C. 6.2.1.5) s'effectue dans les mitochondries.

^x "Mitochondrie" est le terme général désignant les organites cellulaires responsables des fonctions d'oxydation et de stockage de l'énergie. Sarcosomes s'applique plus particulièrement aux organites provenant du muscle. Nous utiliserons indifféremment l'un ou l'autre.

Tableau A

Consomma- tion d'ATP	Réactions	Coenzyme	Phosphorylation liée au substrat	Phosphoryla- tion oxydative (réoxydation des coenzymes par la chaîne respiratoire)
GLYCOLYSE				
- ATP	Glucose + ATP $\longrightarrow$ Glucose-6-P			
- ATP	Fructose-6-P + ATP $\longrightarrow$ Fructose 1-6 di P			
	2 D-glyceraldehyde-3-phosphate + 2 Pi $\longrightarrow$ 2 D - 1, 3 - diphosphoglycérate	2NAD		+ 6 ATP
	2 D - 1, 3 - diphosphoglycérate + 2 ADP $\longrightarrow$ 2 D - 3 - phosphoglycérate + 2 ATP		+ 2 ATP	
	2 phosphoénolpyruvate + 2 ADP $\longrightarrow$ 2 pyruvate + 2 ATP		+ 2 ATP	
	2 pyruvate + 2 CoASH $\longrightarrow$ 2 AcetylCoA + 2 CO ₂	2 NAD		+ 6 ATP
CYCLE DE KREBS				
	2 isocitrate $\longrightarrow$ 2 α -cétoglutarate + 2 CO ₂	2 NAD		+ 6 ATP
	2 α -cétoglutarate + CoASH $\longrightarrow$ 2 succinylCoA + 2 CO ₂	2 NAD		+ 6 ATP
	2 succinylCoA + 2 ADP + 2 Pi $\longrightarrow$ 2 succinate + ATP		+ 2 ATP	
	2 succinate $\longrightarrow$ 2 fumarate	2 FAD		+ 4 ATP
	2 malate $\longrightarrow$ 2 oxalacétate	2 NAD		+ 6 ATP
- 2 ATP			<u>+ 6 ATP</u>	<u>+ 34 ATP</u>

BILAN GENERAL 40 - 2 = 38 ATP

SYNTHESE MAXIMUM D'ATP lors de l'oxydation de 1 molécule de GLUCOSE

Le bilan de la synthèse maximum d'ATP lors de l'oxydation d'une molécule de glucose par le muscle est donné dans le tableau A.

LES MITOCHONDRIES

Les mitochondries se présentent comme un ensemble de deux membranes à structure lipoprotéique. Les invaginations de la membrane interne constituent les crêtes mitochondriales et délimitent la matrice (schéma 2). Il est admis que les mitochondries contiennent au moins : les enzymes d'oxydation du cycle citrique de KREBS, les enzymes d'oxydation du cycle des acides gras, les enzymes de la chaîne respiratoire et les systèmes phosphorylants des phosphorylations oxydatives.

Les travaux de PALADE effectués au microscope électronique et les mesures de consommation d'oxygène ont montré qu'il y avait une relation étroite entre le nombre des crêtes mitochondriales et la vitesse d'oxydation d'un même substrat. En outre, le fait que les enzymes de la chaîne respiratoire représentent 25 % ou plus des protéines mitochondriales, a attiré l'attention sur ces enzymes comme unité non seulement de fonction mais aussi de structure.

LEHNINGER (54) est ainsi arrivé à la conception des "assemblées respiratoires" constituées par l'ensemble élémentaire intégré aux structures des crêtes des enzymes transporteurs d'électrons et des enzymes de couplage. B. CHANCE (12) en a récemment donné un schéma (schéma 3). Les substrats (acides aminés, acides cétoniques, acides gras) une fois franchi la barrière de perméabilité constituée par la membrane externe des mitochondries sont oxydés par les enzymes du cycle de KREBS dont on admet la localisation dans la paroi de la crête en relation avec l'espace intermembranaire. Les électrons (à raison de 2 électrons par mole de substrat) sont transférés par l'intermédiaire de flavoprotéines spécifiques à la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire est constituée par une suite de dérivés oxydo-réducteurs qui se chargent des électrons arrachés au substrat et les transfèrent par paliers successifs jusqu'à l'oxygène, depuis les potentiels les plus électronégatifs jusqu'aux plus positifs (Tableau B).

L'emploi des inhibiteurs, les données de la thermodynamique (la synthèse d'ATP exige 8 000 à 9 000 calories) (Tableau C), les résultats de la spectrophotométrie ont conduit à localiser 3 sites de phosphorylation de l'ADP pour les substrats dont le coenzyme est NAD ou NADP, 2 sites



MITOCHONDRIE

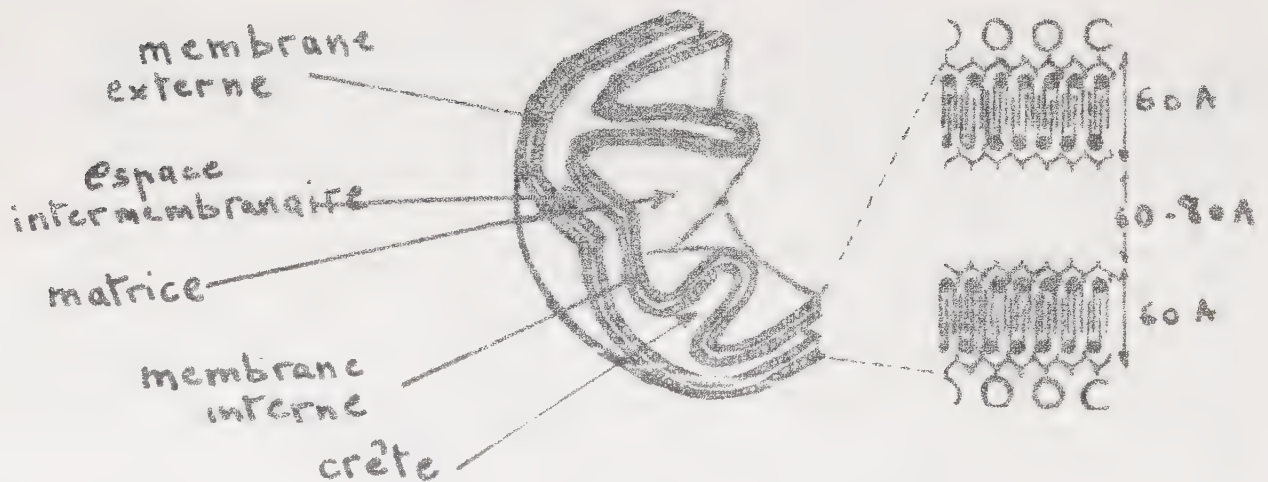
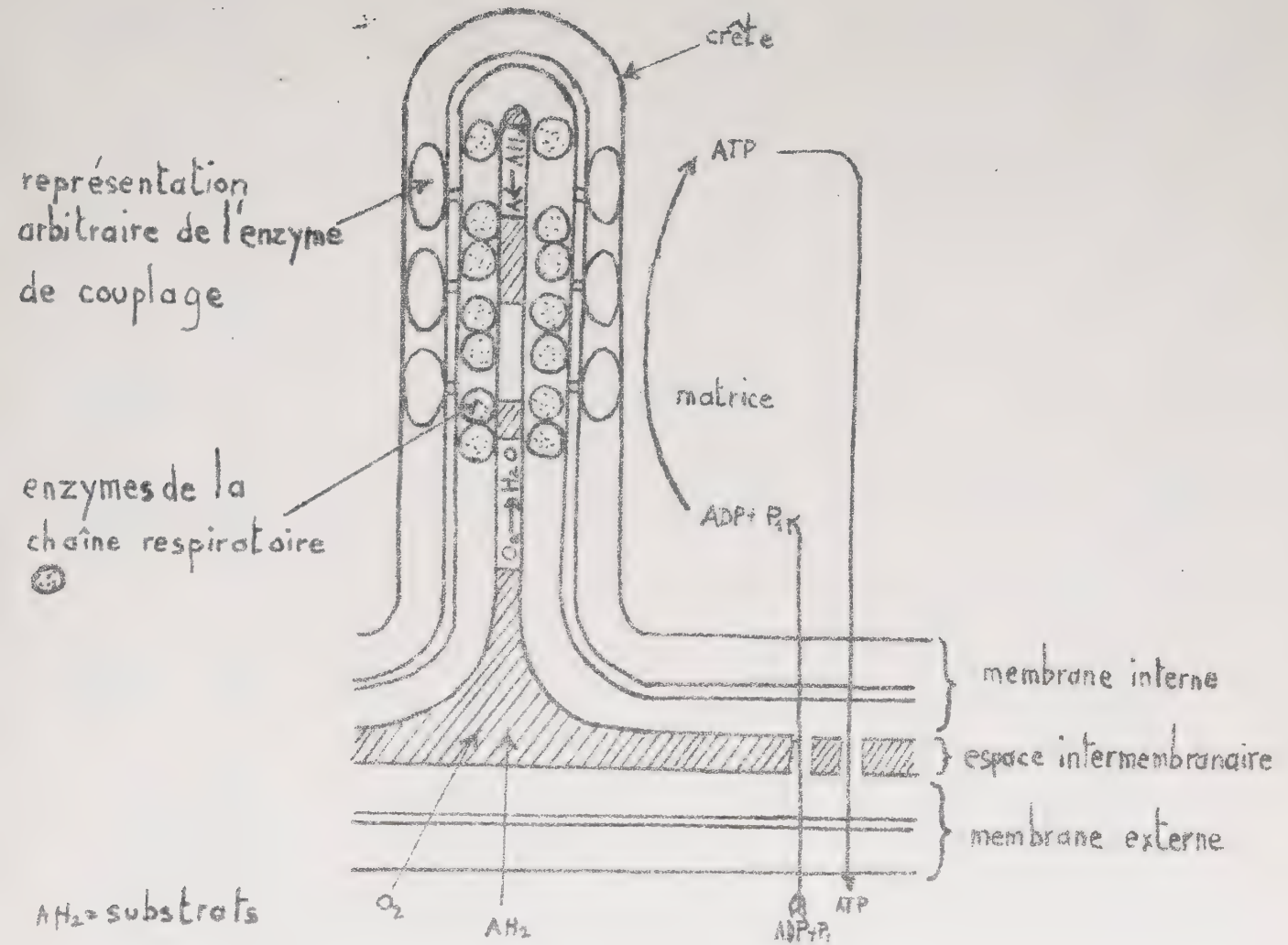


SCHÉMA 2

MODÈLE SCHÉMATIQUE DE LA CRÊTE ET DE L'OXYSOME (particule élémentaire)

180 Å



SCHEMA 3

d'après B. CHANCE (12)

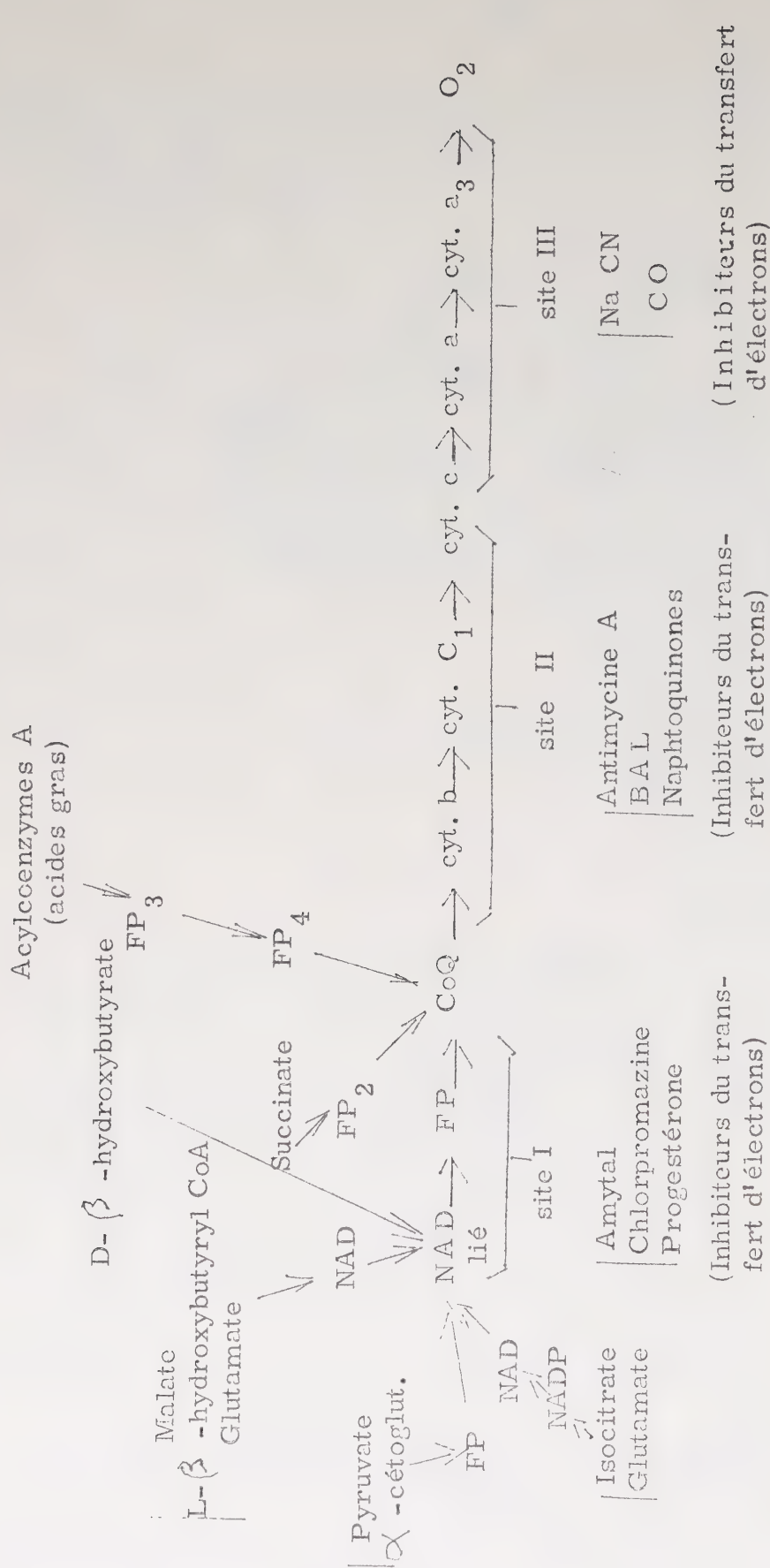


Tableau B

CHAÎNE RESPIRATOIRE ET SITES DE PHOSPHORYLATION

FP = flavoprotéine
 cyt = cytochrome
 BAL = 2,3-dimercapto propanol-I

pour le succinate. Aux 3 sites, l'énergie peut être stockée sous forme d'ATP, mais aussi être utilisée directement, sans passer par l'ATP, par des réactions de type endergonique court-circuitant l'énergie avant la synthèse d'ATP.

Tableau C

Transporteur d'électrons	E'_O volts	$\Delta E'$ volts	ΔG Kcal	Sites de phosphorylation
NAD	- 0,32	0,27	12,2	+
Flavoprotéine	- 0,05	0,09	4,05	0
Cytochrome b	+ 0,04	0,22	9,9	+
Cytochrome c	+ 0,26	0,03	1,35	0
cytochrome a	+ 0,29	0,53	23,8	+
Oxygène	+ 0,82			

RELATIONS THERMODYNAMIQUES DANS LA CHAÎNE RESPIRATOIRE

CONTROLE DE L'INTEGRITE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE

Il faut s'assurer de l'intégrité des structures avant d'entreprendre une étude au niveau des mitochondries. La microscopie électronique permet de tester une fois pour toutes la validité de la technique de préparation. A chaque préparation cependant, des critères biochimiques rapides doivent donner des informations précises concernant l'état des particules.

Les sarcosomes sont récoltés en présence d'ATP dont le rôle est de protéger la mitochondrie. Il est admis, à l'heure actuelle, que les deux membranes mitochondriales diffèrent par leur caractère de perméabilité (78). La membrane externe est librement perméable aux molécules de petite taille qui peuvent diffuser dans l'espace intermembranaire. La membrane interne n'est pas librement perméable, seuls, des processus biochimiquement actifs, font pénétrer dans la matrice ATP, ADP et cations. La détermination du P/O (égal au rapport entre le nombre de protons de

phosphore consommé sur le nombre de p atomes d'oxygène consommé) est un des critères de l'état de la mitochondrie. Dans le cas du glutamate le P/O théorique et moyen est de 3. Dans la mesure où le P/O déterminé s'approche de cette valeur on peut dire que les enzymes responsables de l'oxydation du glutamate, la chaîne de transfert des électrons et la phosphorylation de l'ADP contrôlent mutuellement leur fonctionnement et font partie intégrante des structures de la mitochondrie. Le point le plus sensible de ce système multienzymatique est le couplage de la synthèse d'ATP. Quand le P/O diminue, on dit que les mitochondries sont "découplées".

Dans le contexte cellulaire, les membranes mitochondriales délimitent trois espaces : un espace intramitochondrial ou matrice, un espace intermembranaire et un espace extramitochondrial à la périphérie de la particule. Le lavage des sarcosomes élimine la fraction de cet espace extramitochondrial entraîné lors de la préparation. Les substrats endogènes et petites molécules qui peuvent diffuser à travers de la membrane externe sont aussi éliminés.

LE SYSTEME MULTIENZYMATIQUE MITOCHONDRIAL IMPLIQUE DANS L'OXYDATION DU GLUTAMATE.

Les enzymes

Le glutamate peut s'oxyder par les enzymes suivants :

- L-aspartate : 2 oxoglutarate aminotransferase (E.C. 2.6.1.1)

Glutamate + oxalacétate $\rightleftharpoons$ α -cétoglutarate + aspartate (a)

- L-alanine : 2 oxoglutarate aminotransferase (E.C. 2.6.1.2)

Glutamate + pyruvate $\rightleftharpoons$ α -cétoglutarate + alanine (b)

- L-glutamate NAD (P) oxidoréductase (deaminating) (E.C. 1.4.1.3)

Glutamate + NAD (P) + H₂O $\rightleftharpoons$ α -cétoglutarate + NH₃ + NADPH₂ (c)

Les mitochondries de foie (2) (7) (35) (48) (62), rein (52), muscle (7) et cerveau (21) contiennent les enzymes catalysant les réactions (a) et (c). De plus, les mitochondries du cerveau contiennent un enzyme de décarboxylation du glutamate : L-glutamate 1 carboxy-lyase (E.C. 4.1.1.

15)

Glutamate $\rightleftharpoons$ γ aminobutyrate + CO₂

La réaction (b) est connue au niveau des mitochondries de foie (60).

L'utilisation des produits du métabolisme du glutamate

Indépendamment de l'acide α -céto-glutarique oxydé par le cycle de KREBS, l'ammoniac et l'aspartate sont les plus importants.

L'ammoniac est un poison pour la cellule. Des travaux récents (14) ont montré qu'il pouvait dans les mitochondries de foie, participer à la synthèse de carbamyl phosphate. Ce dernier, en présence d'ornithine, donne de la citrulline. L'ammoniac peut aussi dans les mitochondries être impliqué dans les réductions d'acides α -cétoniques en acides aminés. Ce produit peut enfin diffuser facilement dans le cytoplasme et entrer dans le cycle des réactions de synthèse du carbamyl phosphate, de la glutamine et de l'urée.

Il est admis, à l'heure actuelle, que le malate (49) et l'aspartate (69) (79) sont les substrats qui peuvent diffuser le plus facilement de la mitochondrie dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme l'aspartate peut se transaminer avec l' α -céto-glutarate et donner de l'oxalacétate et du glutamate. Cet acide aminé peut encore participer aux synthèses de l'acide inosinique et de l'acide orotique. Il peut enfin, avec la citrulline donner de l'arginine, précurseur direct de l'urée. Sauf la transamination, toutes ces réactions nécessitent de l'ATP.

Les moyens d'étude du métabolisme du glutamate au niveau des sarcosomes de coeur de Porc.

Nous n'avons pas mis en évidence de transamination du glutamate avec le pyruvate au niveau des sarcosomes de coeur de Porc. Pour évaluer la transamination du glutamate avec l'oxalacétate, il convient de doser le glutamate consommé et l'aspartate apparu. Le pourcentage de transamination est défini par le rapport entre ces deux valeurs.

L'évaluation de la quantité de glutamate oxydé par la déshydrogénase glutamique est plus délicate. Elle ne peut s'effectuer que dans la mesure où les produits de la réaction, α -céto-glutarate, NH_4^+ et $\text{NADH} + \text{H}^+$ s'accumulent dans le milieu réactionnel.

LISTE DES ABREVIATIONS

Nucléotides

ATP : Adénosine 5'-triphosphate.
 ADP : Adénosine 5'-diphosphate.
 AMP : Adénosine 5'-monophosphate.
 NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé.
 NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.
 NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé.
 NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.

Acides aminés

Glu : Acide glutamique.
 Asp : Acide aspartique.
 Ala : Alanine.
 Glu-NH₂ : Glutamine.
 Asp-NH₂ : Asparagine.
 His : Histidine
 Gly : Glycocolle

Autres abréviations

P_i : Phosphate inorganique
 Glucose-6-P : Glucose-6-Phosphate.
 αKG : Acide céto-glutarique.
 OAA : Acide oxalacétique
 FOAA : Monofluoroacétate de sodium.
 F₂OAA : Difluorooxalacétate de sodium.
 Fum. : Acide fumarique.
 TCA : Acide trichloracétique.

En ce qui concerne les nucléotides, les acides aminés, le phosphate inorganique et le glucose-6-phosphate, les abréviations sont celles codifiées par I.U.P.A.C.-I.U.B., Combined Commission on Biochemical Nomenclature (40).

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A - PRODUITS

- 1) Produits utilisés pour la préparation des sarcosomes, leurs incubations et mesures de phosphorylation oxydative.
- Saccharose pour usages scientifiques, Prolabo.
- Cytochrome c oxydé de coeur de cheval, Industrie biologique Française.
- ATPNa_2H_2 , 3 H_2O ; ADPNaH_2 , 2 H_2O ; AMP, H_2O ; Pabst Laboratories.
- NAD, 3 H_2O , Pabst Laboratories.
- Glu, Prolabo.
- L-His (free base), Sigma Chemical Company.
- Acide malonique, L. Light et Co. Ltd.
- Acide fumarique, Merck.
- Arsénite de sodium, AsO_2Na , Prolabo
- Les inhibiteurs de KUN, FOAA et F_2OAA ont été aimablement donnés par KUN lui-même.
- Hexokinase (E.C. 2.7.1.1., ATP : D-hexose 6 phosphotransférase), 5 lots ont été utilisés :
 - a) Seravac, lyophilisée, 50 unités par mg.
 - b) Sigma Chemical Company
 - cristallisée à 120.000 K.M. units/g.

- suspension cristalline dans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 1.100.000 K.M. units/g et 10 mg./cm³ en protéines.
- type IV à 300.000 units/g.
- type III dont l'activité est telle que 15 μ moles de NADP^+ par minute sont réduits en présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (E.C. I.I.I.49).

2) Produits utilisés pour les dosages.

- Acide cholique, Sigma Chemical Company.
- Charbon actif, type Norit X 30, N.V. Norit, Amsterdam.
- Acide α cétoglutarique A grade, acide oxalacétique A grade, acide pyruvique A grade, Calbiochem.
- NADH, 3 H₂O, Pabst Laboratories.
- Ala, Asp, Asp-NH₂, Glu-NH₂, Sigma Chemical Company.
- Déshydrogénase glutamique (E.C. I.4.1.3, L-glutamate : NAD (P) oxidoreductase, deaminating) de foie de boeuf dissoute dans du glycérol à 50 % et ne contenant pas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (activité spécifique = 3 unités/mg.), Boehringer.
- Déshydrogénase lactique (E.C. I.I.I.27, L-lactate : NAD oxidoreductase) de muscle de lapin, solution cristallisée dans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,2 M (activité spécifique = 300 unités/mg.), Boehringer.
- Déshydrogénase malique (E.C.I.I.I.37, L-malate : NAD oxidoreductase) de coeur de Porc en suspension dans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,8 M (activité spécifique = 720 unités/mg.), Boehringer.

B - ANIMAUX

- Les coeurs sont prélevés sur les Porcs 3 minutes après leur électrocution, au début de la chaîne d'abattage. Les animaux ne sont ni baignés dans l'eau chaude, ni buclés.^x
- Les rats utilisés sont de souche Wistar.

^x Nous tenons à remercier le Dr. Ph. FONTENAILLE, Directeur Vétérinaire des Abattoirs de Lyon la Mouche, qui a autorisé notre accès à la chaîne d'abattage et le prélèvement immédiat des coeurs.

C - TECHNIQUES

I) Méthode de préparation et isolement des suspensions mitochondriales.

a) Sarcosomes de muscle cardiaque

Préparation : La technique utilisée est celle de CRANE et coll. (15) à quelques modifications près.

Toutes les opérations sont effectuées à 0° avec du matériel et des réactifs refroidis.

Transportés au laboratoire dans la glace, les coeurs sont débarrassés de leurs tissus annexes et coupés en morceaux ($2,5 \text{ cm}^3$ environ) dans un laps de temps ne dépassant pas 25 minutes après la mort de l'animal.

A 200 g de muscle cardiaque sont ajoutés 600 cm^3 d'une solution de saccharose 0,25 M (8,5 p.100 poids/volume) contenant K_2HPO_4 0,01 M (1,85 g. q.s.p. 1 dm^3 , pH = 7,2). Cette suspension est broyée à l'aide d'un Moulinex HV8. Le pH est ajusté à 7,2 par KOH 6N. La suspension est ensuite homogénéisée pendant 35 secondes dans un broyeur Turmix à vitesse maximale. Le pH est ajusté à 7,2 par KOH 6N. Cette dernière homogénéisation libère les différents constituants cellulaires.

Une première centrifugation est faite dans les conditions suivantes. L'homogénat est réparti dans 4 pots de 250 cm^3 en polypropylène ; l'ensemble est centrifugé à 1600 g (Centrifugeuse MSE "High Speed 18", 3400 tours-minutes, 13 minutes, 0°, couronne angulaire n° 69.179).

Débris cellulaires, noyaux, hématies forment le culot. Le liquide surnageant est décanté et filtré sur plusieurs couches de gaze hydrophile. On recueille un volume V de surnageant dans une éprouvette. V/4 de saccharose 0,25 M est ajouté.

Une seconde centrifugation à 15000 g (Centrifugeuse MSE "High Speed 18", II. 500 tours-minute, 20 minutes, 0°, couronne angulaire n° 69.181) sédimente les sarcosomes.

Les culots sont recueillis avec une palette de verre et repris par une solution de saccharose 0,25 M contenant ATPdiNa $1,53 \cdot 10^{-3}$ M, tamponnée à pH 7,2 par du phosphate de potassium 0,008 M (à raison de 300 mg. de culot frais par cm^3 de suspension). On homogénéise dans un tube de Potter-Elvehjem à l'aide d'un piston en téflon. Le volume final de la suspension ainsi préparée est ajusté de façon à avoir une quantité de protéines voisine de 5 mg. par cm^3 environ (contrôlée par la méthode du biuret "rapide"). Le rendement en sarcosomes oscille entre 350 et 500 mg. de protéines pour 100 g. de muscle cardiaque.

Lavage des sarcosomes : Les culots provenant de la seconde centrifugation (15.000 g) sont homogénéisés dans un tube de Potter-Elvehjem puis repris dans un volume de 40 cm^3 de solution de récolte (saccharose 0,25 M, ATPdiNa $1,53 \cdot 10^{-3}$ M, tamponnée à pH = 7,2 par du phosphate de potassium 0,008 M).

b) Mitochondries de foie de Rat

Nous avons suivi la technique décrite par WEINBACH (81). La sédimentation des mitochondries est faite à 9000 g. Les mitochondries sont lavées 2 fois (Centrifugeuse MSE "High Speed 18", 8700 tours-minutes, 10 minutes, 0°, couronne angulaire n° 69.181).

2) Méthodes de dosage et d'analyse.

a) Mesure des phosphorylations oxydatives

- Choix de la méthode adoptée ; discussion.

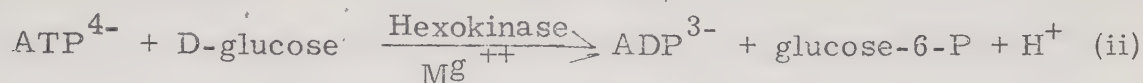
On peut représenter la synthèse d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire par la réaction finale de la phosphorylation de l'ADP :



In vivo, le système est autorégulateur ; l'ATP synthétisé est

constamment réutilisé et l'ADP régénéré. Pour connaître la quantité d'ATP formé, on peut éventuellement le piéger au fur et à mesure de sa formation en évitant que le phosphate minéral, impliqué dans la phosphorylation de l'ADP, soit libéré dans le milieu. Ainsi, par dosage du phosphate minéral consommé, on pourra déterminer la quantité d'ATP synthétisée.

Le piège est constitué par le système contenant de l'hexokinase et du D-glucose :



soit en additionnant (i) et (ii) :



Le glucose-6-P n'est pas hydrolysé par les sarcosomes qui ne contiennent pas de glucose-6-phosphatase (E.C. 3.1.3.9, D-glucose-6-phosphate phosphohydrolase). Il faut s'assurer par ailleurs que l'échantillon d'hexokinase en est exempt.

Compte tenu du ΔF° (-5000 calories environ), la réaction est pratiquement irréversible.

La réaction (iii) montre que la synthèse d'ATP pourrait être déterminée par le dosage du glucose-6-P formé. Cette méthode utilisée par certains auteurs (70) présente un inconvénient. Il existe dans les préparations de sarcosomes un enzyme, la myokinase (E.C. 2.7.4.3, ATP : AMP phosphotransférase), responsable de la réaction



Cette réaction constitue une source secondaire d'ATP, et par suite de glucose-6-P.

L'ADP figurant dans les 2 membres de la réaction (iii), son taux reste constant et maximum. En aérobiose, la vitesse de transfert des électrons du substrat à l'oxygène sera maximale et correspondra à l'état métabolique 3 défini par CHANCE & WILLIAMS (11).

- Dosage des phosphates.

Méthode de FISKE & SUBBAROW (21)

La méthode est basée sur la formation du complexe phosphomolybdique qui donne par réduction un composé de couleur bleue dosé colorimétriquement à 700 mμ (spectrophotomètre Coleman Junior)

Le phosphate minéral est transformé en acide phosphomolybdique dans l'acide sulfurique 10 N. On met dans l'ordre :

0,4 cm³ H₂SO₄ 10 N

0,8 cm³ de molybdate d'ammonium 2,5 p. 100

0,4 cm³ de réactif de FISKE & SUBBAROW, 10 minutes après,

On complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée. On laisse la réaction se développer 30 minutes et on fait les lectures à 700 mμ.

Un blanc réactif, des étalons internes et une courbe étalon (5 à 40 μg de P) sont préparés en même temps et dosés dans les mêmes conditions que les dosages effectués sur les liquides surnageants provenant des milieux d'incubation.

Nous avons utilisé pour la préparation du réducteur du Rhodol ou sulfate de monoéthyl-p-aminophénol (Prolabo).

Méthode de BERENBLUM et CHAIN (4)

Dans cette méthode, le complexe phosphomolybdique formé est extrait par l'isobutanol. Les impuretés et les inhibiteurs éventuels de l'extrait sont ainsi éliminés.

Le liquide, obtenu après minéralisation, est transféré dans une ampoule à décanter de 60 cm³. On rince le matras avec 3 cm³ d'eau, puis 2 fois 2 cm³, soit 7 cm³ au total versés dans l'ampoule à décantation. L'acide sulfurique employé pour la minéralisation suffit à amener le pH à 0,9 - 1,1, valeur nécessaire pour le dosage. Si l'on opère avec des solutions de phosphate insuffisamment acidifiées telles que celles de la gamme étalon, on ajoute 0,5 cm³ du mélange minéralisant de façon à réaliser un pH convenable.

On ajoute successivement $2,5 \text{ cm}^3$ de molybdate d'ammonium à 2,5 % et 8 cm^3 d'isobutanol redistillé. On agite 30 secondes de façon à extraire le complexe phosphomolybdique et on se débarrasse de la couche aqueuse (couche inférieure). On fait ensuite deux lavages avec chaque fois 5 cm^3 de $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ N}$. On agite chaque fois 15 secondes et on élimine chaque fois la couche inférieure. On entraîne finalement l'extrait isobutanolique dans un tube gradué et on rince les ampoules à décantation avec de l'alcool à 95°. On ajuste enfin à 10 cm^3 avec de l'alcool à 95°. Au moment du dosage, on réduit avec $0,1 \text{ cm}^3$ d'une solution de SnCl_2 (10 g. de SnCl_2 dans 25 cm^3 de HCl concentré). On agite et on lit à 700 mμ.

Un blanc réactif et une gamme étalon (2 à 10 μg de P) sont faits dans les mêmes conditions.

- Mesure des rapports P/O.

L'oxygène consommé est mesuré par la méthode directe de WARBURG à 30°, soit en présence d'oxygène pur, soit en présence d'air et, dans les deux cas, en présence de KOH 20 % pour absorber le CO_2 .

Les sarcosomes en suspension dans la solution de récolte sont ajoutés sous un volume de 1 cm^3 dans la cavité réactionnelle contenant $0,8 \text{ cm}^3$ de milieu décrit par KIELLEY (45).

Au temps 0 des mesures, après 10 minutes de préincubation, on ajoute, par l'ampoule latérale, $0,2 \text{ cm}^3$ d'une solution d'hexokinase dans du glucose 0,1 M. Le volume final du milieu réactionnel est $2,1 \text{ cm}^3$. Le pH final est contrôlé pour chaque essai et se trouve toujours compris entre 7 et 7,2.

La composition finale du milieu est la suivante :

L-His $3,8.10^{-2} \text{ M}$

MgCl_2 $3,8.10^{-3} \text{ M}$

KCl $2,9.10^{-2} \text{ M}$

Phosphate de K $1,31.10^{-2} \text{ M}$

AMP $7,7.10^{-4} \text{ M}$

ATP $7,3.10^{-4} \text{ M}$

Saccharose 0,119 M

Cytochrome c oxydé $1,1 \cdot 10^{-5}$ M

Hexokinase : 150 à 200 unités BERGER (5)

Substrats : L-Glu $1 \cdot 10^{-2}$ M et $3 \cdot 10^{-3}$ M

Fumarate $2 \cdot 10^{-2}$ M

Inhibiteurs : Malonate $7,5 \cdot 10^{-4}$ M

AsO₂Na $5 \cdot 10^{-3}$ M

FOAA $2 \cdot 10^{-2}$ M

F₂OAA $1,7 \cdot 10^{-2}$ M

Pour chaque essai on opère avec deux fioles réactionnelles rigoureusement identiques. Au temps 0 des mesures, on arrête la réaction dans une des cellules par addition de TCA 50 % (concentration finale 10 %) pour doser P_i. Simultanément le piège hexokinase + Glucose est introduit dans l'autre cellule.

A la fin des mesures (15 minutes) on arrête la réaction dans l'autre cellule pour doser P_i.

Un essai contrôle (thermobaromètre) est effectué avec des sarcoosomes bouillis.

Les milieux réactionnels additionnés de TCA sont centrifugés à 0° (10.000 g pendant 10 minutes).

Le P_i est dosé par la méthode de FISKE et SUBBAROW.

Le P/O est égal au rapport entre le nombre de µatomes de P et le nombre de µatomes d'oxygène consommés pendant le temps de la réaction.

b) Détermination du QO₂

- Définition

Le QO₂ est exprimé en µlitres d'oxygène par mg. de protéines et par heure. Les protéines sarcosomiques sont dosées par la méthode du biuret (30) modifiée par SLATER (72), ou par la méthode du biuret "rapide" (80).

- Méthode du biuret préconisée par SLATER

A $0,1 \text{ cm}^3$ de la suspension mitochondriale sont ajoutés $0,1 \text{ cm}^3$ de TCA 10 %, On centrifuge 15 minutes à 9000 g. On jette le surnageant et on reprend le culot par 2 cm^3 d'alcool à 50° et une goutte de TCA 50 %. On agite et on centrifuge 10 minutes à 9000 g. On jette le surnageant et on reprend le culot par 2 cm^3 d'alcool à 96° . On agite et on centrifuge 10 minutes à 9000 g. On jette le surnageant.

On ajoute au culot $0,9 \text{ cm}^3$ d'eau distillée. Conjointement 4 tubes contenant respectivement 0,2, 0,4, 0,6 et $0,8 \text{ cm}^3$ d'une solution étalon d'ovalbumine à 5 mg. par cm^3 sont complétés à 1 cm^3 avec de l'eau distillée. On ajoute dans tous les tubes 4 cm^3 de réactif du biuret. On laisse la coloration se développer 24 heures à l'abri de la lumière. On lit à 540 m μ (spectrophotomètre Coleman Junior).

- Méthode du biuret "rapide"

Cette méthode présente l'avantage sur la précédente de doser très rapidement la teneur en protéines de la suspension mitochondriale. Il est ainsi possible d'ajuster à une valeur constante cette dernière.

A une prise d'essai de $0,4 \text{ cm}^3$ de la suspension mitochondriale sont ajoutés $0,2 \text{ cm}^3$ d'une solution de cholate de sodium à 4 % (préparée extemporanément). On attend 2 minutes. On ajoute NaOH 10 % q.s.p. 3 cm^3 compte tenu du volume de CuSO_4 ajouté ensuite. On ajoute enfin $0,3 \text{ cm}^3$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ à 1 %. Conjointement un blanc réactif et une courbe étalon portant sur des prises d'essai de 0,2, 0,4, 0,6 et $0,8 \text{ cm}^3$ d'une solution d'ovalbumine à 5 mg. par cm^3 sont effectués.

On lit immédiatement à 540 m μ (Spectrophotomètre Coleman Junior)

c) Etalonnage de l'hexokinase

Le principe de la technique repose sur l'utilisation de l'acidité apparue au cours de la réaction de formation du Glucose-6-P pour décomposer NaHCO_3 . On mesure le CO_2 dégagé.



L'unité d'hexokinase est définie selon BERGER et al. (5). C'est la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer un dégagement initial de CO_2 de 1 mm³ par minute (mesurée sur 8 minutes), dans les conditions expérimentales suivantes :

Dans une cellule de WARBURG, plate, à une ampoule latérale, on introduit successivement

dans l'ampoule latérale 0,2 cm³ d'une solution d'ATP 0,04 M
(sel de sodium, pH = 7,5),

0,05 cm³ d'une solution de NaHCO_3

0,1 M, MgCl_2 0,2 M

dans la cavité principale 0,5 cm³ d'une solution de NaHCO_3 0,054 M

0,1 cm³ d'une solution de D-glucose 0,5 M

0,75 cm³ de la solution d'Hexokinase

On opère à 35° en atmosphère CO_2 5 %, N_2 95 %, pH 7,5. Le temps d'équilibration est de 10 minutes. Après renversement du contenu de l'ampoule latérale, on mesure pendant 10 minutes le dégagement de CO_2 . On calcule le nombre de mm³ de CO_2 dégagé par minute et par mg d'enzyme.

Les préparations commerciales utilisées voient leur activité diminuer au cours du temps.

d) Dosage du NAD endogène des sarcosomes

- Préparation de l'extrait

Un des culots mitochondriaux obtenus est repris par environ 20 cm³ de Saccharose 0,25 M et homogénéisé dans un tube de Potter-Elvehjem. On ajoute du TCA 50 % (concentration finale 10 %). On centrifuge 10 minutes à 9000 g.

Le surnageant obtenu après centrifugation est traité 4 fois, chaque fois avec un volume égal d'éther froid afin d'éliminer l'acide trichloracétique, opération indispensable pour assurer une adsorption quantitative des nucléotides sur le charbon. On élimine la couche supérieure

éthérée et, après la dernière extraction, on évapore l'excès d'éther grâce à un courant gazeux pendant 2 à 3 minutes, l'extrait étant maintenu à 0°.

- Adsorption sur colonne et élution des nucléotides

Les colonnes de pyrex utilisées contiennent une partie large de 10 mm. et une partie étroite de 2 mm. de diamètre. Le mélange adsorbant est composé de 50 % de Charbon Norit SX 30 spécial et 50 % de Hyflow Supercel lavé, traité par HCl N ou 2 N, rincé à l'eau distillée et séché à l'étuve vers 100 à 150°.

On utilise 250 mg. de mélange adsorbant et on lave en faisant passer sur la colonne 2 cm.³ d'une solution de versène à 2 % (acide éthylène diamine tétracétique neutralisé par NH_4OH N) pour éliminer les cations divalents qui se combinent aux nucléotides provoquant leur adsorption partiellement irréversible. On désactive (en partie) le mélange adsorbant par passage de 5 cm.³ d'une solution d'octanol secondaire à 8 % dans l'éthanol. Après passage d'un volume connu de l'extrait (contenant 200 à 400 µg de nucléotides) on lave la colonne avec de l'eau distillée. Les nucléotides sont ainsi retenus. On élue avec 6 cm.³ de pyridine 50 %.

Toutes les opérations se font sous une pression de 1,2 Kg par cm².

L'éluat est évaporé à sec sous courant d'air froid, puis le cristal pyridine-nucléotide est dissout dans 0,5 cm.³ d'eau distillée

. Chromatographie sur papier

Les feuilles de papier Whatman N° 1 sont lavées au préalable avec une solution de versène à 2 p. 1000 préparée à partir d'une solution de versène à 2 % neutralisée à pH = 7 par NH_4OH N (les cations du papier gênent en effet la séparation des nucléotides). On laisse en contact 6 heures, puis on fait 6 lavages à l'eau distillée. On fait sécher le papier sur une surface polie et propre.

La solution aqueuse contenant les nucléotides d'origine sarco-somique et une solution étalon témoin de nucléotides, sont déposés sur le papier à l'aide d'une "micrometer Syringe Agla" (Burrough's Welcome Ltd, Londres) et à raison de 15 dépôts de 5 mm³. Le chromatogramme est développé avec un solvant descendant (acide isobutyrique 10 volumes, NH₄OH N 6 volumes (50) - saturation : 12 heures - cheminement 20 heures) .

Les Rf calculés par rapport à celui de l'AMP, sont les suivants :

NAD 0,87

ADP 0,82

ATP 0,66

NADP 0,58

Après avoir laissé sécher à l'air le chromatogramme pendant 24 heures, on localise les nucléotides avec une lampe "mineral-light short waves" (253, 8 mμ) ; opaques aux U V, les nucléotides se détachent sur la fluorescence du papier. On cercle les taches au crayon.

- Minéralisation et dosage du P des nucléotides

Les taches sont découpées et placées dans un matras. On ajoute successivement : 0,3 cm³ de H₂SO₄ concentré, 0,2 cm³ de HClO₄ 65 % et 3 gouttes de molybdate d'ammonium 2,5 %. On chauffe très doucement jusqu'au démarrage de la réaction catalysée par le molybdate d'ammonium, puis plus fort. Dès l'apparition d'une coloration jaune, on arrête la minéralisation. Le phosphate est dosé par la méthode de BERENBLUM et CHAIN.

Le NAD endogène est estimé d'après sa teneur en phosphate.

e) Identification et dosage des acides aminés par chromatographie sur papier.

Les acides aminés sont dosés sur les liquides surnageants ayant servi à la détermination des P/O. De plus, en vue de déterminer la teneur en acides aminés endogènes de la suspension mitochondriale, le

dosage est effectué sur le surnageant trichloracétique préparé pour la détermination du NAD endogène.

- Chromatographie sur papier

A l'aide d'une "micrometer syringe Agla" équipée avec une aiguille en verre (les aiguilles en métal perturbent la chromatographie au point d'empêcher toute séparation des acides aminés entre eux et de modifier la coloration à la ninhydrine ; il semble que le métal de l'aiguille forme un complexe avec les acides aminés). Les dépôts des liquides surnageants sont effectués dans les conditions suivantes :

1 x 5 mm.³ lorsque la concentration du glutamate dans les milieux d'incubation est 1.10^{-2} M

3 x 5 mm.³ lorsque la concentration du glutamate dans les milieux d'incubation est 3.10^{-3} M.

La ligne de dépôt est à 10 cm. du bord inférieur de la feuille de papier Whatman n° 3 et les dépôts sont espacés entre eux de 3 cm. Sur la même feuille sont déposés dans des conditions identiques, en volume, à celles des milieux biologiques, des solutions témoins des acides aminés dosés (Glu-NH₂, Asp, Glu, Ala) contenant 1, 2, 3; 4.10^{-2} µmoles de chacun d'eux.

Les chromatogrammes sont développés avec un solvant descendant (butanol, acide formique, eau = 75, 15, 10 ; saturation : 12 heures ; cheminement : 20 heures). Les chromatogrammes sont ensuite séchés à l'étuve dans un courant d'air à 25°, pendant 1 heure, puis trempés dans une solution (préparée extemporanément) de ninhydrine à 0,25 % dans l'acétone R.P. Le chromatogramme est ensuite séché à l'étuve dans un courant d'air à 25° pendant 3 heures.

- Dosage des acides aminés.

Les chromatogrammes sont découpés en bandelettes verticales (sens de la migration) de 2,5 cm. de largeur et contenant chacune la

ou les taches d'un dépôt donné.

Les taches sont photométrées dans un laps de temps ne dépassant pas 2 heures et planimétrés avec un appareil Chromoscan Joyce Loeb (filtre brun n°5026 : 585 mμ).

3) Méthode de dosage et d'analyse enzymatique.

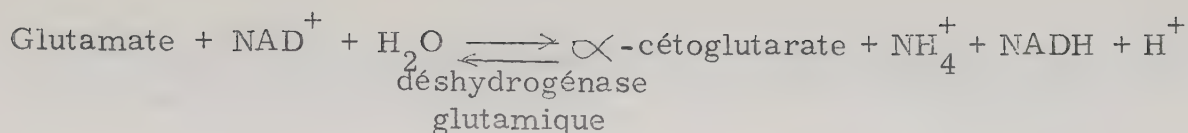
a) Principe

NH_4OH , l' α -cétoglutarate, l'oxalacétate, le malate et le pyruvate sont métabolisés, in vivo, par des enzymes dont le coenzyme est le NAD. Ces enzymes, extraits des tissus animaux à l'échelle industrielle, sont utilisés pour doser ces différents substrats de façon indirecte. On suit spectrophotométriquement à 366 mμ l'oxydation du NADH ou la réduction du NAD^+ , selon le cas.

Dans tous les cas, un dosage témoin est effectué permettant de soustraire les variations de densité optique indépendante de la quantité de substrat à doser dans les milieux biologiques. Dans le cas du dosage de NH_4^+ , par exemple, le NADH utilisé pour le dosage, et l'enzyme lui-même, peuvent être contaminés par un peu de NH_4^+ . De plus, il faut pouvoir soustraire la variation de densité optique due au fait que le NADH est très légèrement autoxydable.

b) Dosage de NH_4OH .

Les méthodes utilisées jusqu'ici pour déterminer NH_4^+ dans les extraits biologiques s'appuient sur la possibilité de transformer NH_4^+ en NH_3 gazeux par alcalinisation et de retenir ce dernier par une solution acide. L'inconvénient de telles méthodes est l'hydrolyse possible d'amides (glutamine, asparagine), si bien que NH_3 gazeux originaire de ces liaisons labiles peut fausser les résultats. Seule, une méthode enzymatique, permet de lever cette difficulté :



L'état d'équilibre de cette réaction

$$K = \frac{(\text{glutamate}) (\text{NAD}^+) (\text{H}_2\text{O})}{(\alpha\text{-cétoglutarate})(\text{NH}_4^+) (\text{NADH})} = 1,8 \cdot 10^{13} \quad (74)$$

permet de doser NH_4^+ par détermination de la quantité de NADH oxydé. La faible affinité de NH_4^+ pour la glutamique déshydrogénase ($K_m = 5,6 \cdot 10^{-2}$) rend nécessaire d'introduire relativement beaucoup d'enzyme, sinon la réaction dure trop longtemps et l'oxydation non spécifique du NADH gêne l'exactitude du dosage.

- Réactifs

On prépare, au moment du dosage, le mélange "test" suivant : tampon phosphate 0,2 M (pH = 7,6), α -cétoglutarate $5 \cdot 10^{-3}$ M, NADH $4 \cdot 10^{-3}$ M. Une solution de NH_4^+ contenant 0,5 μmole NH_4^+ par 0,5 cm^3 d'eau distillée est préparée avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ RP.

- Dosage : d'après KIRSTEN (46) ^x

Les dosages sont effectués sur les liquides surnageants débarassés de leur TCA comme précédemment (dosage du NAD endogène de la suspension mitochondriale). Des étalons internes et une courbe étalon allant de 0,1 à 0,5 μmoles de NH_4^+ sont dosés dans les mêmes conditions.

On opère de la façon suivante en ajoutant successivement dans

^x Les conditions et le processus de ce dosage sont valables pour les autres dosages du même type que nous avons utilisés dans notre travail (α -cétoglutarate, pyruvate, malate et oxalacétate). Seules, seront ensuite précisées, pour chacun d'eux, leurs conditions particulières.

les cuves d'un spectrophotomètre Beckmann D. U.

CUVE 1 : $1,5 \text{ cm}^3$ de mélange "test" + $0,5 \text{ cm}^3$ d'eau distillée + 20 mm^3 de déshydrogénase glutamique, soit 2800 unités définies selon STRECKER (14).

CUVE 2 : $1,5 \text{ cm}^3$ de mélange "test" + $0,5 \text{ cm}^3$ de solution à doser (courbe étalon ou milieu biologique ou milieu biologique + une quantité connue de NH_4^+ pour les étalons internes)
+ 20 mm^3 de déshydrogénase glutamique

On agite 5 secondes, on vérifie le pH : il est ajusté à 7,4 si cela est nécessaire.

La cinétique de la réoxydation de NADH est suivie à 366 m μ pendant 27 minutes à la température ambiante. La variation de densité optique spécifique du dosage de NH_4^+ est égale à la différence des densités optiques entre la cuve 1 et la cuve 2 .

Les calculs sont effectués en utilisant :

$$\frac{1}{\epsilon_{366 \text{ m}\mu} \text{ NADH}} = 0,303$$

c) Dosage de l'acide α -cétoglutarique

Le principe du dosage repose sur la même réaction que celui de NH_4^+ .

- Réactifs

On prépare, au moment du dosage, le mélange "test" suivant : tampon phosphate 0,2 M (pH = 7,6), NH_4^+ $5 \cdot 10^{-3}$ M, NADH $4 \cdot 10^{-3}$ M . Une solution d' α -cétoglutarate contenant 0,5 μ moles par $0,5 \text{ cm}^3$ d'eau distillée est préparée.

- Dosage

Les dosages sont effectués selon un processus analogue à celui de NH_4^+ .

CUVE 1 : 1,5 cm³ de mélange test + 0,5 cm³ d'eau distillée + 20 mm³ de déshydrogénase glutamique, soit 2800 unités définies selon STRECKER (14).

CUVE 2 : 1,5 cm³ de mélange "test" + 0,5 cm³ de solution à doser (courbe étalon ou milieu biologique ou milieu biologique + une quantité connue d' α -cétooglutarate pour les étalons internes).

La différence de densité optique entre la cuve 1 et la cuve 2 est constante au bout de 4 minutes. L'augmentation de la vitesse de la réaction peut s'expliquer par la forte concentration de NH_4^+ et conformément au schéma de l'ordre de formation du complexe enzyme-substrats proposé par FISHER avec NADPH comme coenzyme (20) : enzyme-NADPH- NH_4^+ - α -cétooglutarate

d) Dosage de l'oxalacétate

En présence de déshydrogénase malique, la réaction du dosage est la suivante :



On suit spectrophotométriquement l'oxydation du NADH

- Réactifs

On prépare, au moment du dosage, le mélange "test" suivant ; tampon phosphate 0,2 M (pH = 7,6) contenant NADH 0,004 M et une solution étalon : contenant 0,5 μ moles d'oxalacétate pour 0,5 cm³ d'eau distillée. Compte tenu de la décarboxylation dans le temps de l'oxalacétate, cette solution doit être préparée extemporanément. Par ailleurs, la teneur en pyruvate de l'échantillon d'oxalacétate utilisé doit être testée.

- Dosage

CUVE 1 : 1,5 cm³ de mélange "test" + 0,5 cm³ d'eau distillée + 30 mm³ de déshydrogénase malique, soit 1650 unités définies selon OCHOA (61)

CUVE 2 : 1,5 cm³ de mélange "test" + 0,5 cm³ de solution à doser + 30 mm³ de déshydrogénase malique.

La cinétique de la réaction est de 4 minutes.

e) Dosage de l'acide pyruvique

En présence de déshydrogénase lactique, la réaction du dosage est la suivante :



On suit spectrophotométriquement la réoxydation du NADH

- Réactifs

On prépare au moment du dosage le mélange "test" suivant :
tampon phosphate 0,2 M (pH = 7,6) contenant NADH 0,004 M.

Une solution étalon contenant 0,5 μ moles de pyruvate pour 0,5 cm³ H₂O distillée.

- Dosage

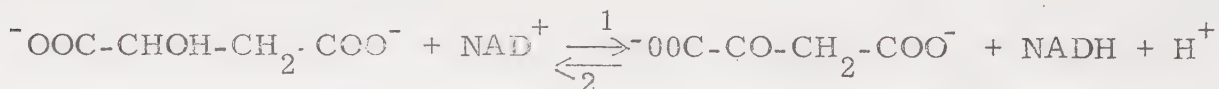
CUVE 1 : 1,5 cm³ de mélange "test" + 0,5 cm³ d'eau distillée +
5 mm³ de déshydrogénase lactique, soit 500 unités définies selon
BUCHER (9).

CUVE 2 : 1,5 cm³ de mélange "test" + 0,5 cm³ de solution à doser
+ 5 mm³ de déshydrogénase lactique.

La cinétique de la réaction dure 4 minutes.

f) Dosage de l'acide malique

En présence de déshydrogénase malique, la réaction du dosage est la suivante :



La réaction équilibrée est complètement déplacée dans le sens 1 si l'oxalacétate formé est piégé par de l'hydrazine. On suit spectrophotométriquement la réduction de NAD⁺.

- Réactifs

On prépare, au moment du dosage, les solutions suivantes :
tampon Gly 0,5 M, Hydrazine 0,4 M et une solution de NAD⁺ 5,2.10⁻² M.

En outre une solution standard contenant 0,5 μ moles de malate pour 0,5 cm³ d'eau distillée est préparée.

- Dosage

CUVE 1 : 1,5 cm³ de tampon Gly 0,5 M Hydrazine 0,4 M + 0,1 cm³ de solution de NAD⁺ $5,2 \cdot 10^{-2}$ M + 0,5 cm³ d'eau distillée + 20 mm³ de déshydrogénase malique, soit 1100 unités définies selon OCHOA (61).

CUVE 2 : 1,5 cm³ de tampon + 0,1 cm³ de solution de NAD⁺ + 0,5 cm³ de solution à doser + 20 mm³ de déshydrogénase malique.

La cinétique de la réaction est de 1 heure et demie à la température ambiante.

4) Mise en évidence de la déshydrogénase glutamique par la méthode de STRECKER (74).

- Principe

L'oxydation du glutamate au niveau des sarcosomes de coeur de Porc est mesurée par l'augmentation de la densité optique à 340 m μ provoquée par la réduction du NAD⁺.

- Réactifs

Les solutions suivantes sont préparées : Glutamate de K 0,5 M, NAD⁺ $5,2 \cdot 10^{-2}$ M, tampon phosphate 0,05 M (pH 7,6), CN⁻ 1,15 M, suspension mitochondriale à 5 mg. de protéines sarcosomiques par cm³ de suspension.

- Mesure

On procède de la façon suivante :

CUVE 1 : 2,1 cm³ de tampon phosphate 0,05 M + 0,1 cm³ NAD⁺ $5,2 \cdot 10^{-2}$ M, + 0,1 cm³ de CN⁻ 1,15 M + 0,2 cm³ de Glu 0,5 M + 0,1 cm³ de suspension mitochondriale.

CUVE 2 : Sauf le glutamate, les mêmes réactifs, constituant le témoin, sont introduits.

La réduction du NAD⁺ est suivie jusqu'à l'obtention de l'état d'équilibre.

5) Calculs statistiques

Afin d'apprécier la précision de nos résultats, nous avons procédé à leur analyse statistique.

Les formules que nous avons utilisées au cours de ce travail sont rappelées ci-dessous :

- Moyenne arithmétique : Les moyennes indiquées dans nos tableaux sont des moyennes arithmétiques, obtenues en divisant la somme des valeurs individuelles par le nombre des observations.

- Erreur standard sur la moyenne : l'erreur standard sur la moyenne indique avec quelle précision la moyenne a été déterminée. Elle est définie par la formule :

$$M = \sqrt{\frac{\sum (x - M)^2}{N (N - 1)}}$$

où

x = une valeur individuelle

M = la moyenne arithmétique des valeurs

N = Le nombre des observations.

- Différence significative : la formule de STUDENT permet d'apprécier si une différence entre deux moyennes est significative ou due au hasard

$$\text{Formule de STUDENT : } t = \frac{M_1 - M_2}{S} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}}$$

où

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - M_1)^2 + \sum (x - M_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}}$$

M_1 et M_2 sont les moyennes des observations des groupes 1 et 2 .

N_1 et N_2 représentent le nombre des observations pour les groupes 1 et 2 .

" t " permet de comparer les deux moyennes en fonction de leur déviation standard ; connaissant "t", on trouve dans les tables de FISCHER la probabilité P avec laquelle la différence observée peut être due au hasard.

Nous considérons qu'une différence entre deux moyennes est statistiquement significative, ou plus simplement significative, lorsque P est inférieur à 0,05 .

Si P est compris entre 0,05 et 0,1, la différence est probablement significative, mais, pour l'affirmer, il faut augmenter le nombre des observations.

Enfin, si P est supérieur à 0,1, la différence est probablement due au hasard.

CHAPITRE II

L'OXYDATION DU GLUTAMATE : INFLUENCE
DE DIFFERENTS FACTEURS METABOLIQUES
ET INHIBITEURS

A - INFLUENCE DE NAD^+ ET NADP^+ AJOUTES, DE L'ATMOSPHERE (AIR et O_2), DU FUMARATE ET DU PIEGE HEXOKINASE PLUS GLUCOSE, SUR L'OXYDATION DU GLUTAMATE ET SON INHIBITION PAR LE MALONATE.

Nous allons montrer dans cette partie l'influence de ces différents facteurs sur le QO_2 du glutamate, la consommation de glutamate et la formation d'aspartate.

1) Oxydation du glutamate en milieu Kielley sans NAD^+ ajouté (ou en milieu pauvre en NAD^+)

Tableau I

2,8	$\frac{+}{-}$	0,38	millimoles par mg de
(11.)			protéines sarcosomiques

Teneurs moyennes en NAD ENDOGENE au niveau des
SARCOSOMES DE COEUR DE PORC non lavés .

() : le nombre des essais.

Le NAD dosé représente la somme globale $\text{NAD}^+ + \text{NADH}$.

Le Tableau I montre que la teneur en NAD endogène des sarcosomes de coeur de Porc est faible. Si l'on n'ajoute pas NAD^+ au milieu d'incubation, les substrats, pour s'oxyder, n'auront à leur disposition que ce seul NAD endogène. Le tableau II donne les résultats préliminaires obtenus dans de telles conditions. On voit que l'oxydation du glutamate se fait avec formation d'aspartate. Le malonate, inhibiteur de la déshydrogénase succinique (E.C. 1.3.99.1), en empêchant ainsi la formation d'oxalacétate, inhibe l'oxydation du glutamate et l'apparition d'aspartate. Cependant, une addition supplémentaire de fumarate (qui permet la formation d'oxalacétate) rétablit l'oxydation du glutamate et la production d'aspartate. L'arsénite, inhibiteur de la déshydrogénase α -cétoglutarique (E.C. 1.2.4.2) bloque totalement l'oxydation du glutamate et l'apparition d'aspartate. On voit aussi, que l'addition supplémentaire de fumarate lève non seulement l'inhibition du QO_2 par le malonate, mais l'augmente encore de 10 %. Le fumarate seul, enfin, s'oxyde à une vitesse très inférieure à celle du glutamate ; le malonate n'inhibe pas son oxydation.

2) Influence du NAD^+ ajouté sur le QO_2 du glutamate et son inhibition par le malonate. Influence de l'oxygène pur comparée à celle de l'air.

Le tableau III montre que le malonate inhibe à environ 94 % le QO_2 du glutamate quand il n'y a pas de NAD^+ ajouté au milieu d'incubation (essais 1). L'addition de NAD^+ augmente ce QO_2 de 21 % ; en présence de malonate la consommation d'oxygène est augmentée de 200 % par NAD^+ et par rapport aux mêmes essais sans NAD^+ .

On voit dans le tableau IV que l'oxygène pur augmente très notablement le QO_2 du glutamate, même quand il n'y a pas de NAD^+ ajouté (52 %), si on compare les résultats obtenus en Air et oxygène pur. En oxygène pur, l'addition de NAD^+ a des effets sur la consommation d'oxygène, avec et sans malonate, identiques à ceux observés en atmosphère Air. Dans les deux cas, des quantités croissantes de NAD^+ n'affectent pas significativement le phénomène.

3) Influence de NAD^+ sur la consommation de glutamate et la formation d'aspartate, en atmosphère Air et oxygène pur.

Le tableau V montre que les rapports $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Asp}}$ et $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Glu}}$ sont

Tableau II

Substrats et inhibiteurs ^x	Q O ₂	Formation d'aspartate
Glutamate	55,7 $\pm$ 5 (5)	+++
Glutarate + malonate	5,0 $\pm$ 1,7 (4)	0
Glutamate + malonate + fumarate	61 $\pm$ 4,4 (5)	+++
Glutamate + arsénite	2 $\pm$ 0,3 (3)	0
Fumarate	27,8 $\pm$ 4,8 (5)	0
Fumarate + malonate	29,3 $\pm$ 4 (2)	0

Oxydation du GLUTAMATE, en milieu Kieley sans NAD⁺ ajouté, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose, au niveau de consommation de coeur de Porc.

^x Conditions habituelles : Glutamate 1.10^{-2} M, Malonate $0.75.10^{-3}$ M, Fumarate 5.10^{-3} M, Arsénite 10^{-3} M, () : le nombre des essais.

Tableau III

NAD ⁺		0		2.10 ⁻³ M
Malonate		0	+	0
N° des essais		1	2	3
Q O ₂	85,2 ± 4,1 (37)	5,5 ± 0,75 (32)	103,1 ± 3,75 (40)	16,5 ± 1,6 (34)
		9,4 % par rapport aux essais 1		84 % par rapport aux essais 3
Augmentation		21 % par rapport aux essais 1	200 % par rapport aux essais 2	
Levée d'inhibition			10 % par rapport aux essais 2	
Facteur P de probabilité		par rapport aux essais 1 P < 0,001	par rapport aux essais 2 P < 0,001	

Influence du NAD⁺ ajouté sur l'oxydation du GLUTAMATE et son inhibition par le MALONATE, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻²M, Malonate 0,75.10⁻³M.

Protéines sarcosomiques: 4,9 ± 0,3 mg par essai

(28 déterminations)

() : le nombre des essais .

Tableau IV

NAD ⁺	0	1.10 ⁻³ M	2.10 ⁻³ M	3.10 ⁻³ M	4.10 ⁻³ M
AIR					
Q O ₂	28,9 ± 13,1 (3)	34,5 ± 10,6 (3)	31,9 ± 7,5 (3)	47,6 (1)	34,6 ± 12,1 (2)
Inhibition par le malonate	93 ± 0,8 % (31)	68 ± 6 % (4)	81 ± 2 % (35)	56 ± 7 % (2)	70 ± 7 % (4)
OXYGENE					
Q O ₂	44 ± 12,1 (3)	51,6 ± 13,1 (3)	52,1 ± 13,1 (3)	62,5 ± 13,3 (2)	56,2 ± 20 (2)
Inhibition par le malonate	87 ± 5 % (7)	68 ± 9 % (6)	66 ± 10 % (7)	64 ± 12 % (4)	82 ± 3 % (4)
Augmentation du Q O ₂ par O ₂	52 %	49 %	63 %	31 %	62 %

Influence de quantités croissantes de NAD⁺ ajouté sur l'oxydation du GLUTAMATE et son inhibition par le MALONATE, en atmosphère AIR et OXYGENE et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻²M, Malonate 0,75.10⁻³M.

() : le nombre des essais.

Tableau V

NAD ⁺	0	1.10 ⁻³ M	2.10 ⁻³ M	3.10 ⁻³ M	4.10 ⁻³ M
N° des essais	1	2	3	4	5
Δ Asp ^x	17,6 ± 2,7 (18)	6,4 ± 2,1 (10)	11,3 ± 1,9 (17)	7,9 ± 3,1 (6)	7,3 ± 2,2 (7)
Inhibition		64 %	36 %	55 %	59 %
		par rapport aux essais 1	par rapport aux essais 1	par rapport aux essais 1	par rapport aux essais 1
$\frac{\Delta O}{\Delta Asp}$ ^{xx}	3,5 ± 0,3 (21)	10,2 ± 2,4 (9)	8,1 ± 1,2 (21)	9,1 ± 1,9 (6)	6,2 ± 0,7 (9)
$\frac{\Delta O}{\Delta Glu}$	2,8 ± 0,5 (11)	3,3 ± 0,06 (4)	4,8 ± 0,9 (12)	6 ± 0,5 (4)	11,1 ± 0,6 (4)
$\frac{\Delta Asp^x}{\Delta Glu^x}$	18,7 ± 3,8 21,2 ± 4,4 (11)	8 ± 3,4 11,3 ± 4,2 (6)	12,6 ± 2,7 19,4 ± 3,5 (11)	9,9 ± 4,4 24,5 ± 9,7 (4)	5,2 ± 2,3 4,8 ± 1,8 (5)
Transamination	88 %	71 %	65 %	40 %	109 %
Facteur P de probabilité		par rapport aux essais 1 P < 0,02	par rapport aux essais 1 P = 0,05	par rapport aux essais 1 P = 0,05	par rapport aux essais 1 P < 0,05

Influence de quantités croissantes de NAD⁺ ajouté sur l'oxydation du GLUTAMATE et la formation d'ASPARTATE, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻² M.

^x Δ Asp et Δ Glu exprimés respectivement en µmoles apparues ou consommées par 10 mg de protéines et par heure. Le rapport $\Delta Asp / \Delta Glu$ permet de calculer le pourcentage de transamination.

^{xx} ΔO exprimé en µatomes d'oxygène consommés par essai. ΔAsp et ΔGlu exprimés respectivement en µmoles apparues ou consommées par essai.

() le nombre des essais .

voisins de 3 lorsqu'il n'y a pas de NAD^+ ajouté au milieu d'incubation des sarcosomes. Le pourcentage de transamination est alors de 88 %.

Si on ajoute NAD^+ , la quantité d'aspartate diminue très notablement, $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Asp}}$ et $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Glu}}$ augmentent, mais le premier rapport beaucoup plus que le second ; le pourcentage de transamination diminue ; la consommation du glutamate est diminuée par l'addition de NAD^+ sauf à la concentration $3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en coenzyme ajouté.

En oxygène pur, comme le montre le tableau VI, sont observés des effets analogues à ceux de l'air.

Le malonate (tableau VII), que ce soit, en atmosphère air ou oxygène pur, et en présence ou non de NAD^+ ajouté, inhibe totalement ou presque l'apparition d'aspartate.

4) Influence comparée de NAD^+ et NADP^+ ajoutés sur le QO_2 du glutamate et son inhibition par le malonate, et sur la consommation du glutamate et la formation d'aspartate. Effets de l'addition du piège hexokinase plus glucose.

Le tableau VIII montre que NAD^+ augmente nettement plus le QO_2 du glutamate que NADP^+ (22 % au lieu de 7 %). En présence de malonate, NAD^+ et NADP^+ augmentent la consommation d'oxygène de façon à peu près semblable par rapport aux mêmes essais sans coenzyme ajouté.

On voit par ailleurs, dans ce tableau, que le piège hexokinase plus glucose stimule la respiration des sarcosomes incubés avec du glutamate de 200 %. En présence de NAD^+ ajouté cette stimulation est de 145 %, en présence de NADP^+ 200 %.

Si l'on considère l'effet de l'addition des coenzymes en absence du piège hexokinase plus glucose, on voit que l'addition de NAD^+ augmente le QO_2 de 56 % alors que NADP^+ l'augmente de 10 % seulement. En présence de malonate, NAD^+ augmente la consommation d'oxygène de 195 % et NADP^+ de 116 %.

Le P/O du glutamate, déterminé en absence de coenzyme ajouté, n'est pas modifié par l'addition de NAD^+ et NADP^+ , comme le montre le tableau IX.

Tableau VI

A I R		O X Y G E N E		
NAD ⁺		0	2.10 ⁻³ M	0
N° des essais		1	2	3
		4		
Δ Asp ^x	12,7 ± 3,8 (6)	9,7 ± 2,7 (7)	19,4 ± 5,1 (8)	16,6 ± 3,8 (7)
Inhibition				
par rapport aux essais 1				
24 %				
par rapport aux essais 3				
14 %				
Δ O ^{xx}	2 ± 0,5 (2)	5,4 ± 1,4 (4)	2 ± 0,4 (3)	5 ± 1,1 (4)
Δ Asp				
Δ O	1,1 ± 0,1 (2)	2,4 ± 0,5 (4)	1,8 ± 0,1 (3)	3,1 ± 0,5 (4)
Δ Glu				
Δ Asp ^x	28,4 31,2 (1)	15,8 ± 1,9 35,3 ± 2,5 (3)	21 ± 7 22,7 ± 6,6 (3)	10,2 ± 7,4 19,4 ± 4 (4)
Δ Glu ^x				
Transamination	91 %	44 %	92 %	52 %
Δ NH ₄ ⁺ xxx	1,3 (2)	0,9 (2)	0,9 (2)	2 (2)

Influence de l'AIR et de l'OXYGENE sur l'oxydation du GLUTAMATE et la formation d'ASPARTATE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻²M.

x Δ Asp et Δ Glu exprimés respectivement en μmoles apparues ou consommées par 10 mg de protéines et par heure. Le rapport Δ Asp / Δ Glu permet de calculer le pourcentage de transamination.

xx Δ O exprimé en μmoles d'oxygène consommés par essai. Δ Asp et Δ Glu exprimés respectivement en μmoles apparues ou consommées par essai.

xxx Δ NH₄⁺ exprimé en μmoles de NH₄ OH apparues par 10 mg de protéines et par heure.
() : le nombre des essais.

Tableau VII

NAD ⁺	0			1.10 ⁻³ M			2.10 ⁻³ M		
Malonate	0	+	AIR	0	+	0	+		
$\Delta_{Asp\ x}$	12,7 $\pm$ 2,9 (9)	1,4 $\pm$ 0,6 (9)	3 $\pm$ 0,8 (5)	traces ^{xx} (5)	7,8 $\pm$ 2 (7)	1,9 $\pm$ 0,9 (7)			
OXYGENE									
Δ_{Asp}	17,9 $\pm$ 3,3 (6)	2 $\pm$ 1 (5)	10,1 $\pm$ 3 (5)	traces (4)	10,1 $\pm$ 2,7 (5)	traces (5)			

Influence du MALONATE sur la formation d'ASPARTATE lors de l'oxydation du GLUTAMATE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté, en atmosphère AIR et OXYGENE, et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

^x Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻² M. Malonate 0,75.10⁻³ M.
^{xx} Δ_{Asp} exprimé en μ moles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.
^{xx} traces = quantité inférieure à 1 μ mole par 10 mg. de protéines et par heure.
 () : le nombre des essais.

Tableau VIII

Coenzyme	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M
Malonate	0	+	+
N° des essais	1	2	3
		4	5
		6	
	HEXOKINASE + GLUCOSE		
Q O ₂	99,8 ± 7,4 (5)	8,2 ± 2,1 (3)	122,7 ± 7,6 (3)
		16,2 ± 0,9 (3)	107 ± 3,5 (15)
			15,6 ± 0,8 (9)
Inhibition	91 % par rapport aux essais 1	86 % par rapport aux essais 3	85 % par rapport aux essais 5
Augmentation	22 % par rapport aux essais 1	98 % par rapport aux essais 2	7 % par rapport aux essais 1
			90 % par rapport aux essais 2
	SANS HEXOKINASE + GLUCOSE		
Q O ₂	31,9 ± 4,3 (9)	6,3 ± 1,4 (4)	49,9 ± 5,6 (8)
		18,6 ± 0,8 (3)	35,4 ± 6,3 (8)
			13,6 (1)
Inhibition	80 % par rapport aux essais 1	62 % par rapport aux essais 3	62 % par rapport aux essais 5
Augmentation	56 % par rapport aux essais 1	195 % par rapport aux essais 2	10 % par rapport aux essais 1
			116 % par rapport aux essais 2

Influence de l'addition du PIEGE HEXOKINASE + GLUCOSE sur l'oxydation du GLUTAMATE et son inhibition par le MALONATE, en atmosphère AIR.
Etude comparative de l'influence de NAD⁺ ou NADP⁺ ajouté.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻²M, malonate 0,75.10⁻³M.

() : le nombre des essais

Tableau IX

Coenzyme	O	$\text{NAD}^+ 2.10^{-3}\text{M}$	$\text{NADP}^+ 2.10^{-3}\text{M}$
$\frac{\overset{x}{\text{P}}}{\text{O}}$	$2,4 \pm 0,1$ (18)	$2,5 \pm 0,08$ (16)	$2,6 \pm 0$ (2)

Influence du NAD^+ et du NADP^+ ajouté sur la DETERMINATION DU P/O, en atmosphère Air.

- Conditions habituelles : Glutamate 1.10^{-2}M
 $\times$ P représente le nombre de μ atomes de Phosphate minéral consommé par essai.
 O représente le nombre de μ atomes d'oxygène consommé par essai.
 () : le nombre des essais.

On voit dans le tableau X qu'il faut atteindre la concentration en $\text{NADP}^+ 2.10^{-3}\text{M}$ dans le volume final pour que la formation d'aspartate et le pourcentage de transamination soient inhibés. Le rapport $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Asp}}$ augmente, mais moins que lorsque NAD^+ est ajouté (tableau V). On voit de plus, que les rapports $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Glu}}$ et la consommation de glutamate ne sont pas modifiés par l'addition de NADP^+ .

5) Influence du fumarate sur l'inhibition de l'oxydation du glutamate par le malonate.

- Le tableau XI met en relief les résultats suivants, obtenus en atmosphère air :

En absence de NAD^+ ajouté, l'addition de fumarate permet de

Tableau X

NADP ⁺	0	0,5.10 ⁻³ M	1.10 ⁻³ M	2.10 ⁻³ M	3.10 ⁻³ M	4.10 ⁻³ M
N° des essais	1	2	3	4	5	6
Δ Asp x	26,9 $\pm$ 3,2 (7)	32 $\pm$ 3,1 (2)	34,5 $\pm$ 0,8 (2)	13,9 $\pm$ 1,4 (6)	15,6 $\pm$ 0 (2)	14,8 $\pm$ 0,8 (2)
Inhibition				48 % par rapport aux essais 1	43 % par rapport aux essais 1	45 % par rapport aux essais 1
$\frac{\Delta O}{\Delta Asp}$ xx	4 $\pm$ 0,5 (8)	3 $\pm$ 0,4 (2)	2,4 $\pm$ 0,4 (2)	7,7 $\pm$ 0,9 (7)	6,6 $\pm$ 0,05 (2)	5,5 $\pm$ 0,9 (2)
$\frac{\Delta O}{\Delta Glu}$	2,8 $\pm$ 0,3 (4)	1,9 $\pm$ 0,1 (2)	2,3 $\pm$ 0,1 (2)	3,1 $\pm$ 0,5 (3)	3,6 $\pm$ 0 (3)	3,25 $\pm$ 0,16 (2)
$\frac{\Delta Asp}{\Delta Glu}$ x	29,6 $\pm$ 6,3 28 $\pm$ 4,9 (3)	32,4 $\pm$ 3,5 48,7 $\pm$ 2,8 (2)	34,5 $\pm$ 0,25 36,1 $\pm$ 2 (2)	11 $\pm$ 0,1 31 $\pm$ 14,2 (2)	15,6 $\pm$ 0 28 $\pm$ 0 (2)	14,8 $\pm$ 0,8 29,4 $\pm$ 0,6 (2)
Transamination	105 %	65 %	96 %	35 %	56 %	50 %
Facteur P de probabilité				par rapport aux essais 1	par rapport aux essais 1	par rapport aux essais 1

Influence de quantités croissantes de NADP⁺ ajouté sur l'oxydation du GLUTA-MATE et la formation d'ASPARTATE, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

x Conditions habituelles : Glutamate 3.10⁻³ M.

Δ Asp et Δ Glu exprimés respectivement en μ moles apparues ou consommées par 10 mg de protéines et par heure. Le rapport Δ Asp / Δ Glu permet de calculer le pourcentage de transamination.

xx Δ O exprimé en μ moles d'oxygène consommé par essai. Δ Asp et Δ Glu exprimés respectivement en μ moles apparues ou consommées par essai.

() : le nombre des essais.

Tableau XI

Substrat	Glu	Glu + malonate	Glu + malonate + fumarate	Glu + fumarate	Fumarate	Fumarate + malonate
N° des essais	1	2	3	4	5	6
SANS						
Q_{O_2}	55,7 $\pm$ 5 (5)	5,9 $\pm$ 1,7 (4)	61 $\pm$ 4,3 (5)	66,6 $\pm$ 6 (4)	27,8 $\pm$ 4,8 (2)	29,8 $\pm$ 4 (2)
Δ_{Asp}^x	24,5 $\pm$ 4,9 (2)	traces (2)	23,9 $\pm$ 8,6 (3)	38,5 $\pm$ 13,5 (2)	0 (2)	0 (2)
$\frac{\Delta_{O_{xx}}}{\Delta_{Asp}}$	2,1 $\pm$ 0 (2)		2,2 $\pm$ 0,2 (2)	1,9 $\pm$ 0,5 (2)		

NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M						
Q_{O_2}	64,9 $\pm$ 6,7 (4)	21,5 $\pm$ 8,7 (4)	67,8 $\pm$ 13 (4)	71,3 $\pm$ 5,9 (4)	58,1 $\pm$ 6 (7)	52,9 $\pm$ 9,2 (3)
Δ_{Asp}^x	16,3 (1)	traces (1)	27,5 $\pm$ 21,5 (2)	19,4 $\pm$ 12,3 (2)	0 (2)	0 (2)
$\frac{\Delta_{O_{xx}}}{\Delta_{Asp}}$	3,4 (1)		6,7 $\pm$ 5,1 (2)	6,5 $\pm$ 3,5 (2)		

Influence du FUMARATE sur l'inhibition de l'oxydation du GLUTAMATE par le MALONATE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté, en atmosphère AIR et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

^x Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻²M, Malonate 0,75.10⁻³M, Fumarate 2.10⁻²M.

^x Δ_{Asp} exprimées en μ moles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.

^{xx} $\Delta_{O_{xx}}$ exprimé en μ atomes d'oxygène consommés par essai et

Δ_{Asp} en μ moles apparues par essai.

() : le nombre des essais.

lever l'inhibition du QO_2 observée en présence de malonate. Le QO_2 est rétabli à 91 % si l'on compare les essais 3 (glutamate plus malonate plus fumarate) aux essais 4 (glutamate plus fumarate).

Avec NAD^+ , la consommation d'oxygène en présence de glutamate plus malonate est augmentée de 270 % par rapport aux mêmes essais sans NAD^+ . L'addition de fumarate permet de lever l'inhibition du QO_2 . Le QO_2 est alors rétabli à 95 % (essais 3 par rapport aux essais 4).

Qu'il y ait NAD^+ ou non, la formation d'aspartate est bloquée en présence de glutamate plus malonate. L'addition de fumarate fait réapparaître l'aspartate dans tous les cas, mais, en absence de NAD^+ , la quantité reste très inférieure à celle mesurée en présence de glutamate et fumarate (essais 3 par rapport aux essais 4 sans NAD^+ ajouté).

NAD^+ ajouté augmente dans tous les cas le rapport $\frac{\Delta O}{\Delta A_{sp}}$ et de façon spectaculaire en milieu glutamate plus malonate plus fumarate. En absence de NAD^+ , ce rapport reste voisin de 2 dans tous les cas.

On voit enfin sur ce tableau que NAD^+ ajouté augmente de 100 % le QO_2 du glutamate seul. Le malonate n'inhibe pas significativement l'oxydation de ce substrat (essais 5 et 6).

- Les résultats obtenus en oxygène pur sont ceux du tableau XII :

En absence de NAD^+ , le malonate inhibe à près de 97 % l'oxydation du glutamate (essais 2). Le fumarate rétablit la consommation d'oxygène à 86 % (essais 3 par rapport aux essais 4).

NAD^+ augmente de 58 % la consommation d'oxygène quand le glutamate est oxydé en présence du malonate et par rapport aux mêmes essais sans NAD^+ . Dans ce cas là, non seulement le fumarate rétablit le QO_2 mais encore le stimule (112 %) (essais 3 par rapport aux essais 4).

Qu'il y ait ou non NAD^+ , le malonate empêche toute formation d'aspartate. L'addition de fumarate augmente fortement la quantité d'aspartate par rapport à celle mesurée lorsque le glutamate est oxydé seul (essais 3 et 4 par rapport aux essais 1). Il est étonnant de constater que les essais glutamate plus fumarate donnent beaucoup plus d'aspartate que les essais glutamate plus malonate plus fumarate.

Le rapport $\frac{\Delta O}{\Delta A_{sp}}$ (essais 3 et 4) est notablement moins augmenté par addition de NAD^+ que dans le cas des observations faites en atmosphère air (tableau XI).

Tableau XII

Substrat	Glu	Glu + malonate	Glu + malonate + fumarate	Glu + fumarate	Fumarate	Fumarate + malonate
N° des essais	1	2	3	4	5	6
SANS NAD ⁺ AJOUTE						
Q O ₂	58	2	76	87,8	27	29,8
Δ_{Asp}^x	(1) 21,8	(1) traces	(1) 46,7 + 1,1	(1) 54,5	(1) 0	(1) 0
$\frac{\Delta O}{\Delta Asp}^{xx}$	(1) 2,4 (1)	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)
			1,5 (1)	1,4 (1)		

51

NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M						
Q O ₂	74,8	13,4	112,2	100	70,2	43,7
Δ_{Asp}^x	(1) 7,7	(1) traces	(1) 32,4	(1) 67,6	(1) 0	(1) 0
$\frac{\Delta O}{\Delta Asp}^{xx}$	(1) 8,6 (1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
			3,7 (1)	1,3 (1)		

Influence du FUMARATE sur l'inhibition de l'oxydation du GLUTAMATE par le MALONATE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté, en atmosphère OXYGENE et en présence du piège Hexokinase + Glucose .

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻²M, Malonate 0,75.10⁻³M, Fumarate 2.10⁻² M.

^x Δ_{Asp} exprimé en μ moles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.

^{xx} $\frac{\Delta O}{\Delta Asp}$ exprimé en μ moles d'oxygène consommés par essai et Δ_{Asp} en μ moles apparues par essai.

() : le nombre des essais.

Si le malonate enfin, n'affecte pas l'oxydation du fumarate en absence de NAD^+ , on note, en sa présence, une inhibition d'environ 40 %. Le NAD^+ par contre stimule fortement l'oxydation du fumarate seul.

- Le tableau XIII montre que, si l'on étudie l'oxydation du fumarate en présence d'ions NH_4^+ ajoutés, il ne se forme en aucun cas de l'aspartate.

Tableau XIII

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	O	$2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
QO_2	$62,4 \pm 23,6$ (3)	$56,2 \pm 23,5$ (3)
Δ Asp	0 (3)	0 (3)

Influence de l'addition d'ions NH_4^+ sur l'oxydation du FUMARATE, en présence de NAD^+ ajouté, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

L'addition d'ions NH_4^+ , par ailleurs, n'affecte pas le QO_2 du glutamate comme le montrent les résultats du tableau XIV.

B - INFLUENCE DE L'ARSENITE ET DES INHIBITEURS DE KUN SUR L'OXYDATION DU GLUTAMATE.

Retenons pour l'instant, des résultats précédents, un fait saillant : les sarcosomes de coeur de Porc consomment très peu d'oxygène

Tableau XIV

NH_4^+	0	NH_4Cl 2.10^{-3}M	NH_4Cl 4.10^{-3}M	NH_4Cl 6.10^{-3}M	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6.10^{-3}M
SANS NAD^+ AJOUTE					
QO_2	64,5 (2)	64,5 (2)	53,5 (2)	70 (2)	69 (2)
ΔAsp^x	22,7 (2)	28,8 (2)	12,8 (2)	26 (2)	40 (2)
$\text{NAD}^+ 2.10^{-3}\text{M}$					
QO_2	70 (2)	76 (2)	55 (2)	75 (2)	
ΔAsp^x	0,13 (2)	7,8 (2)	5,7 (2)	1,9 (2)	

Influence de l'addition d'ions NH_4^+ sur l'oxydation du GLUTAMATE et la formation d'ASPARTATE, en présence ou non de NAD^+ ajouté, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose .

Conditions habituelles : Glutamate 1.10^{-2}M
 $x \Delta \text{Asp}$ exprimé en μmoles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.
 () le nombre des essais.

lorsqu'on leur donne du glutamate à oxyder en présence de malonate. Si on ajoute NAD^+ au milieu d'incubation, cette quantité d'oxygène augmente de 200 %. A priori cette augmentation ne peut être due qu'à des déshydrogénases situées en amont de la déshydrogénase succinique dans le cycle de KREBS. La déshydrogénase α céto-glutarique (E.C. 1.2.4.2) paraît difficilement impliquée seule, puisqu'il faudrait que la totalité de l'acide α céto-glutarique formé provienne de la transamination ; or le malonate inhibe cette dernière. Seule hypothèse plausible: NAD^+ stimule une déshydrogénase glutamique. L'arsénite, inhibiteur de la déshydrogénase α céto-glutarique, et les inhibiteurs de KUN (53) (difluoro oxalacétate, inhibiteur de la transaminase glutamique - aspartique, E.C. 2.6.1.1, et monofluorooxalacétate, inhibiteur de la déshydrogénase malique, E.C. 1.1.37) doivent nous apporter une série d'informations supplémentaires.

1) Influence de l'arsénite sur l'oxydation du glutamate et la formation d'aspartate, en présence ou non de NAD^+ ajouté.

Les résultats sont donnés dans le tableau XV. En air et en oxygène pur, l'arsénite inhibe fortement l'oxydation du glutamate (95 et 100 %). NAD^+ augmente de 192 % la consommation d'oxygène par rapport aux mêmes essais sans NAD^+ dans le premier cas. En oxygène pur, l'effet de l'addition de NAD^+ est encore plus accentué.

Dans tous les cas, comme le montre le tableau XVI, l'arsénite empêche toute formation d'aspartate : le cycle de KREBS est donc bloqué au niveau de l' α -céto-glutarate.

Le tableau XVII montre que NADP^+ stimule beaucoup moins la consommation d'oxygène que NAD^+ ajouté lorsque l'oxydation du glutamate est inhibée par l'arsénite.

2) Influence des inhibiteurs de KUN sur l'oxydation du glutamate et son inhibition par le malonate.

On voit dans le tableau XVIII, que le difluorooxalacétate, inhibiteur de la transaminase (E.C. 2.6.1.1) inhibe, en absence de NAD^+ ajouté, l'oxydation du glutamate à 93 %. Si on ajoute NAD^+ , l'inhibition tombe à 80 % et la quantité d'oxygène consommé augmente de 258 %. Par ailleurs, la concentration en F_2OAA est suffisante pour inhiber totalement la transa -

Tableau XV

NAD ⁺		0	2.10 ⁻³ M	
As O ₂ Na	0	+	0	+
N° des essais	1	2	3	4
A I R				
Q O ₂	60 , $\pm$ 9,3 (8)	2,7 $\pm$ 0,5 (11)	73,3 $\pm$ 12,1 (6)	7,9 $\pm$ 0,8 (8)
Inhibition		9 6 % par rapport aux essais 1		89 % par rapport aux essais 3
Facteur P de probabilité				P << 0,001 par rapport aux essais 2
Augmentation			20 % par rapport aux essais 1	192 % par rapport aux essais 2
O X Y G E N E				
Q O ₂	58 (1)	0 (1)	74,8 (1)	10,5 (1)
Inhibition		100 % par rapport aux essais 1		86 % par rapport aux essais 3
Augmentation			28 % par rapport aux essais 1	

Influence de l'ARSENITE sur l'oxydation du GLUTAMATE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté, en atmosphère AIR et OXYGENE et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻² M, Arsénite de sodium 5.10⁻³ M.

() : le nombre des essais .

Tableau XVI

NAD ⁺ As O ₂ Na	AIR		
	0	+	2.10 ⁻³ M
Δ Asp ^x	18,9 ± 5 (3)	traces	10,6 ± 3,3 (3)
			traces (3)
OXYGENE			
Δ Asp	21,8 (1)	traces	7,7 (1)
			traces (1)

Influence de l'ARSENITE sur l'oxydation du GLUTAMATE et la formation d'ASPARTATE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté, en atmosphère AIR et OXYGENE et en présence du piège Hexokinase + Glucose .

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻² M, Arsénite de sodium 5.10⁻³ M
^x Δ Asp exprimé en μmoles apparues par 10 mg de protéines et par heure
 () : le nombre des essais .

Tableau XVII

Coenzyme	0		NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M		NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	
As O ₂ Na	0	+	0	+	0	+
N° des essais	1	2	3	4	5	6
Q O ₂	85,4 ± 21,6 (2)	3,5 ± 0,8 (4)	97,1 ± 20,4 (2)	8,8 ± 0,4 (4)	97,9 ± 18,3 (2)	6 ± 0,4 (4)
Inhibition	96 % par rapport aux essais 1		90 % par rapport aux essais 3		94 % par rapport aux essais 5	
Augmentation	14 % par rapport aux essais 1		150 % par rapport aux essais 2		15 % par rapport aux essais 1	
					71 % par rapport aux essais 2	

Influence du NAD⁺ ou NADP⁺ ajouté sur l'oxydation du GLUTAMATE et son inhibition par l'ARSENITE, en atmosphère AIR et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻² M

Arsénite de sodium 5.10⁻³ M.

() : le nombre des essais.

Tableau XVIII

NAD ⁺		0		2.10 ⁻³ M	
F ₂ OAA		0		+	
N° des essais		1	2	3	4
Q O ₂	117, 2 ⁺ 67, 8 (2)	8, 1 ⁺ 2, 3 (4)	142 ⁺ 56 (2)	29 ⁺ 15 (3)	
	Inhibition	93 % par rapport aux essais 1	79 % par rapport aux essais 3		
Augmentation		21 % par rapport aux essais 1	258 % par rapport aux essais 2		
Δ Asp ^x	18 6 (2)	traces (2)	16 (2)	traces (2)	
Δ O ^{xx}	2, 4 (2)	5 (2)			
Δ Asp					

Influence du DIFLUOROXYALACETATE sur l'oxydation du GLUTAMATE et la formation d'ASPARTATE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose .

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻²M, F₂ OAA 2.10⁻²M.
^x Δ Asp exprimé en μ moles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.
^{xx} $\frac{\Delta O}{\Delta Asp}$ exprimé en μ atomes d'oxygène consommés par essai.
 () le nombre des essais .

Tableau XIX

NAD ⁺	0	0	+	+
FOAA	0	0	+	0
Malonate	0	+	+	+
N° des essais	1	2	3	4
Q O ₂	149,2 ± 80,8 (2)	145,2 ± 82,8 (2)	60,8 ± 20,5 (4)	155 ± 75 (2)
Inhibition			59 % par rapport aux essais 2	150,8 ± 42 (2)
Augmentation			3 % par rapport aux essais 1	88,3 ± 29 (4)
			8 % par rapport aux essais 2	44 % par rapport aux essais 5
				14,5 % par rapport aux essais 3

65

Δ Asp ^x	25,8 (1)	24 (1)	10,5 (1)	7,5 (1)	6 (1)	8 (1)
--------------------	-------------	-----------	-------------	------------	----------	----------

Influence du MALONATE et du MONOFLUOROOXALACETATE sur l'oxydation du + GLUTAMATE et la formation d'ASPARTATE en présence de FUMARATE, de NAD⁺ ajouté ou non, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10^{-2} M, Malonate $0,75.10^{-3}$ M

FOAA $1,7.10^{-2}$ M.

^x Δ Asp exprimé en μmoles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.
() : le nombre des essais .

mination, avec et sans NAD^+ , puisqu'il n'y a plus formation d'aspartate. NAD^+ augmente considérablement le rapport $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Asp}}$.

En présence de fumarate, le malonate n'inhibe pas l'oxydation du glutamate (tableau XI). Si, dans ces conditions (tableau XIX), on ajoute le monofluorooxalacétate, inhibiteur de la déshydrogénase malique (52), le QO_2 est inhibé à 59 % en absence de NAD^+ , 44 % avec NAD^+ . NAD^+ diminue, dans tous les cas, l'accumulation d'aspartate. En absence de NAD^+ , l'inhibition de la transamination est plus élevée en présence de malonate et FOAA qu'en présence de malonate seul.

CHAPITRE III

MISE EN EVIDENCE DIRECTE DU FONCTIONNEMENT
DE LA DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE ET
ETUDE DE L'INFLUENCE DES FACTEURS ENDO-
GENES SUR LE METABOLISME DU GLUTAMATE.

A - LA DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE.

Les résultats du chapitre II inclinent à penser que l'addition de NAD^+ au milieu d'incubation des sarcosomes stimule l'oxydation du glutamate par la déshydrogénase glutamique aux dépens de la transamination. Dans la mesure où les produits de la désamination oxydative du glutamate ne sont pas réutilisés par le métabolisme de la mitochondrie, on doit pouvoir les doser.

1) Détermination de $\text{NADH} + \text{H}^+$ par la méthode de STRECKER (74)^x.

Dans les conditions où la chaîne respiratoire n'est pas inhibée, $\text{NADH} + \text{H}^+$, résultant du fonctionnement de l'enzyme, est immédiatement réoxydé. Par contre, si on bloque le mouvement des électrons en un point de la chaîne respiratoire, on peut doser spectrophotométriquement l'accumulation de NADH jusqu'à l'état d'équilibre. Les résultats obtenus, quand la chaîne respiratoire est inhibée par le cyanure, sont donnés dans le tableau XX.

x

Nous tenons à remercier très vivement Mademoiselle Nicole PIALOUX pour ce travail.

Tableau XX

$$6,9 \pm 2,6 \quad (6)$$

μmoles $\text{NADH} + \text{H}^+$ / 10 mg protéines

Mise en évidence de la DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE par la méthode de STRECKER en présence de NAD^+ et de cyanure.

Conditions $\text{NAD}^+ 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
 $\text{CN}^- 5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
 $\text{GLUTAMATE } 5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$

() le nombre des essais

2) Détermination de NH_4^+

Quand il n'y a pas de NAD^+ ajouté au milieu d'incubation, il s'accumule 1,3 μmoles de NH_4^+ pour 10 mg. de protéines et par heure. Le malonate ne modifie pas cette quantité, l'arsénite la diminue (tableau XXI). NAD^+ ajouté, augmente cette quantité de NH_4^+ de 70 %, de 95 % en présence de malonate, de 325 % en présence d'arsénite. En aucun cas, le rapport $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{NH}_4^+}$ n'est égal à 1.

En ce qui concerne le NADP^+ , les résultats sont ceux du tableau XXII. NADP^+ ajouté augmente la quantité de NH_4^+ de 350 %, de 300 % en présence de malonate, de 720 % en présence d'arsénite. Les rapports $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{NH}_4^+}$ sont voisins de 1.

Les concentrations croissantes de NAD^+ et NADP^+ n'augmentent pas les quantités de NH_4^+ dosées dès la concentration $1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ en coenzyme ajouté, comme le montre le tableau XXIII. Les quantités de NH_4^+ accumulées avec NADP^+ ajouté sont nettement plus élevées que celles accumulées avec NAD^+ .

Tableau XXI

Coenzyme	0	0	0	NAD ⁺	2.10 ⁻³ M	+	0
Malonate	0	+	0	0	+	0	+
As O ₂ Na	0	0	+	0	0	0	+
N° des essais	1	2	3	4	5	6	

ΔNH_4^+ x	1,3 ± 0,17 (22)	1,4 ± 0,2 (12)	0,4 ± 0,2 (4)	2,2 ± 0,35 (24)	2,7 ± 0,7 (13)	1,7 ± 0,26 (4)
Facteur P de probabilité				P < 0,02 P < 0,01 par rapport aux essais 1	P = 0,1 P < 0,02 par rapport aux essais 2	P = 0,31 par rapport aux essais 3

ΔO xxx				15,6 ± 2,3 (24)	7,1 ± 0,5 (13)	4,6 ± 0,3 (3)
ΔO xxx				15,6 ± 2,3 (24)	7,1 ± 0,5 (13)	4,6 ± 0,3 (3)
ΔNH_4^+				15,6 ± 2,3 (24)	7,1 ± 0,5 (13)	4,6 ± 0,3 (3)

DÉTERMINATION de NH_4^+ formé lors de l'oxydation de GLUCAMINE et son inhibition par le MALONATE et l'ARSENITE, en présence de NAD⁺ ajouté ou non, en atmosphère Air et piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻³ M. Malonate 0.78.10⁻³ M.

Arsénite de sodium 5.10⁻³ M.

ΔNH_4^+ exprimé en μmoles apparus par 10 mg de protéines et par heure.

ΔO exprimé en μmoles d'oxygène consommés par 10 mg de protéines et par heure, correspondant à l'augmentation de la consommation d'oxygène

par addition de NAD⁺.

xxx ΔO et ΔNH_4^+ correspondant respectivement à l'augmentation de la consommation d'oxygène et de NH_4^+ apparus par addition de NAD⁺.

xxxxx

Le facteur P entre parenthèses est celui calculé en éliminant la valeur très écartée par rapport à la moyenne des résultats.

() : le nombre des essais.

Tableau XXII

Coenzyme	0	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M		
Malonate	0	+	0	0
As O ₂ Na	0	0	+	+
N° des essais	1	2	3	4
ΔNH_4^+	1,3 $\pm$ 0,17 (22)	1,4 $\pm$ 0,3 (12)	0,4 $\pm$ 0,2 (4)	5,8 $\pm$ 0,6 (13)
Facteur P				P < 0,001
de probabilité				par rapport aux essais 1
ΔO	xx			7,1 $\pm$ 1,5 (13)
				par rapport aux essais 2
				7,4 $\pm$ 1,1 (5)
				par rapport aux essais 3
				2,2 $\pm$ 0,4 (4)
$\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{NH}_4^+}$	xxx			$\frac{7,1}{4,5} = 1,5$
				$\frac{7,4}{4,2} = 1,7$
				$\frac{2,2}{2,9} = 0,7$

DETERMINATION de NH₄⁺ formé lors de l'oxydation du GLUTAMATE et son inhibition par le MALONATE et l'ARSENITE, en présence de NADP⁺ ajouté ou non, en atmosphère Air et piège Hexokinase + Glucose .

Conditions strictement identiques au Tableau XXI

Tableau XXIII

NAD^+	0	$0,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$1 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$3 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$4 \cdot 10^{-3} \text{M}$
$\Delta_{\text{NH}_4^+}^{\times}$	$1,0 \pm 0$ (2)	$1,1 \pm 0$ (2)	$1,15 \pm 0,15$ (2)	$1,15 \pm 0,15$ (2)	$1,0 \pm 0$ (2)	$1,2 \pm 0$ (2)
NADP^+	0	$0,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$1 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$2 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$3 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$4 \cdot 10^{-3} \text{M}$
$\Delta_{\text{NH}_4^+}$	$1,0 \pm 0$ (2)	$5,35 \pm 0,15$ (2)	$5,25 \pm 0,15$ (2)	$6,05 \pm 0,95$ (2)	$5,35 \pm 0,15$ (2)	$4,55 \pm 0,55$ (2)

DETERMINATION de NH_4^+ formé sous l'influence de l'addition de QUANTITES CROISSANTES de NAD^+ et NADP^+ lors de l'oxydation du GLUTAMATE, en atmosphère Air et piège Hexokinase + Glucose .

Conditions habituelles : Glutamate $1 \cdot 10^{-2} \text{M}$.

$\Delta_{\text{NH}_4^+}$ exprimé en μmoles apparues par 10 mg. de protéines et par heure .

() : le nombre des essais .

B - LA RESPIRATION ENDOGENE DES SARCOSOMES ET L'INFLUENCE DU LAVAGE DES SARCOSOMES SUR LE METABOLISME DU GLUTAMATE.

Les dosages de NH_4^+ et NADH sont en faveur de l'existence de la déshydrogénase glutamique. Dans quelle mesure ne s'agit-il pas d'un enzyme provenant d'une phase extramitochondriale entraînée lors de la préparation. Dans quelle mesure aussi, la respiration des sarcosomes en présence de glutamate ajouté est-elle affectée par les substrats endogènes ?

1) La respiration endogène des sarcosomes.

Les sarcosomes non lavés contiennent, entre autre, (tableau XXIV) des acides aminés : glutamine, glutamate et alanine en quantités non négligeables, histidine et aspartate en quantités très faibles. Quant aux acides α cétoniques, seules des quantités très faibles de pyruvate ont été décelées. Des traces de NH_4^+ sont dosées.

Une fois les sarcosomes lavés, la teneur en substrats endogènes devient nulle. Une quantité à peu près équivalente de ces substrats est retrouvée dans le surnageant de lavage. Des traces de glutamine peuvent cependant subsister dans les sarcosomes lavés.

Les mesures de respiration, effectuées avec des sarcosomes non lavés, sont données dans le tableau XXV. Sans coenzyme ajouté, le QO_2 est faible, le malonate l'inhibe à 20 %, l'arsénite à 85 %. En additionnant NAD^+ le QO_2 augmente de 247 % et les inhibiteurs affectent ce QO_2 dans le même ordre de grandeur que précédemment. En présence de ces derniers, NAD^+ augmente la consommation d'oxygène de 200 % pour le malonate et de 170 % pour l'arsénite. NADP^+ n'augmente le QO_2 de la respiration endogène que de 48 %, le malonate et l'arsénite inhibent ce QO_2 d'environ 70 %.

L'inhibition par l'arsénite du QO_2 de la respiration endogène augmente en fonction de quantités croissantes de NAD^+ ajouté (tableau XXVI) c'est l'inverse qui est observé quand les sarcosomes oxydent du glutamate.

En absence de coenzyme ajouté, le P/O des substrats endogènes est très faible. Avec NAD^+ et NADP^+ ajouté, il est voisin de 3. (tableau XXVII)

Tableau XXIV

Suspension	SARCOSOMES NON LAVES	SARCOSOMES LAVES	SURNAGEANT DE LAVAGE
Protéines	10 mg (2)	$7,1 \pm 0,6$ mg (2)	$2,9 \pm 0,6$ mg(2)
Acides aminés			
Glu - NH_2	$1,5 \pm 0,26$ (3)	traces (2)	$1 \pm 0,25$ (2)
Asp	traces (3)	0 (2)	traces (2)
Glu	$0,4 \pm 0,17$ (3)	0 (2)	$0,6 \pm 0,1$ (2)
Ala	$0,52 \pm 0,16$ (3)	0 (2)	$0,45 \pm 0,15$ (2)
His	traces (3)	0 (2)	traces (2)
Acides cétoniques			
α KG	0 (2)	0 (2)	0 (2)
OAA	0 (2)	0 (2)	0 (2)
Pyruvique	traces (2)	0 (2)	traces (2)
NH_4^+	$0,34 \pm 0,2$ (2)	traces (2)	0,4 (1)

Dosage des ACIDES AMINES, des ACIDES CETONIQUES et de NH_4^+ au niveau des sarcosomes non lavés, lavés et du surnageant de lavage.

Récolte et lavage des sarcosomes sont effectués en présence de saccharose - ATP - phosphate.

Tous les résultats sont donnés en μ moles

traces = quantités inférieures à 0,25 μ mole .

Coenzyme	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M
Malonate	0	+	0
As O ₂ Na	0	0	+
N° des essais	1	2	3
Q O ₂	16,4 ± 4 (14)	13,2 ± 5,6 (2)	2,4 ± 0,2 (5)
Augmentation	247 % par rapport aux essais 1	200 % par rapport aux essais 2	170 % par rapport aux essais 3
Inhibition	20 % par rapport aux essais 1	32 % par rapport aux essais 4	88 % par rapport aux essais 4
29	71 % par rapport à l'essai 7	74 % par rapport à l'essai 7	164 % par rapport aux essais 3

Influence du NAD⁺ et du NADP⁺ sur la RESPIRATION ENDOGENE de sarcosomes non lavés et son inhibition par le MALONATE et l'ARSENITE, en atmosphère. Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles sans substrat ajouté

Malonate : 7.5.10⁻⁴ M

Arsénite : 5.10⁻³ M

() : le nombre des essais .

Tableau XXVI

Coenzyme	0	NAD ⁺ 1.10 ⁻³ M	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	NAD ⁺ 4.10 ⁻³ M
Substrat		GLUTAMATE	1.10 ⁻² M	
Inhibition du Q O ₂ par As O ₂ Na	96 % (4)	86 % (2)	88 % (3)	78 % (2)
Substrat	ENDOGENE			
Inhibition du Q O ₂ par As O ₂ Na	54 % (1)	71 % (1)	84 % (1)	78 % (1)

Etude de l'influence de QUANTITES CROISSANTES de NAD⁺ sur l'inhibition par l'ARSENITE de l'oxydation du GLUTAMATE et de l'oxydation des SUBSTRATS ENDOGENES, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻² M,
As O₂ Na 5.10⁻³ M.

Tableau XXVII

Coenzyme	O	$\text{NAD}^+ 2.10^{-3} \text{M}$	$\text{NADP}^+ 2.10^{-3} \text{M}$
μ atomes de phosphate estérifiés	$1,35 \pm 0,15$ (2)	$34,1 \pm 0$ (2)	$10,55 \pm 0,05$ (2)
μ atomes O consommés	$1,8 \pm 0,04$ (2)	$12,65 \pm 0,15$ (2)	$4,15 \pm 0$ (2)
$\frac{\text{P}}{\text{O}}$	0,7	2,7	2,5

DETERMINATION DU P/O au cours de l'OXYDATION des SUBSTRATS ENDOGENES, en présence ou non de NAD^+ et NADP^+ ajouté, en atmosphère Air .

Conditions habituelles

(.) le nombre des essais

L'effet de NAD^+ sur l'oxydation des substrats endogènes est tout aussi spectaculaire quand les sarcosomes sont incubés en absence du piège hexokinase plus glucose (tableau XXVIII). Par contre, dans ces conditions, NADP^+ est inopérant. Dans tous les cas, la respiration est considérablement augmentée par l'addition du piège hexokinase plus glucose.

2) La respiration endogène après lavage des sarcosomes.

On voit dans le tableau XXIX que le lavage des sarcosomes supprime presque complètement la respiration endogène. L'addition de NAD^+ ne modifie pas le faible QO_2 mesuré.

Tableau XXVIII

PIEGE		HEXOKINASE +	GLUCOSE	sans PIEGE HEXOKINASE + GLUCOSE		
Coenzyme	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M
N° des essais	1	2	3	4	5	6
Q O ₂	13,4 ± 0,33 (4)	61,4 ± 9,5 (7)	19,5 ± 6,6 (4)	6,9 ± 0 (1)	27,9 ± 2,2 (5)	6,8 ± 1,6 (2)
Augmentation		360 % par rapport aux essais 1	45 % par rapport aux essais 1		304 % par rapport aux essais 4	0 % par rapport aux essais 4

Augmentation par addition du piège	94 % par rapport aux essais 4	120 % par rapport aux essais 5	186 % par rapport aux essais 5
--	-------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------

Influence du PIEGE HEXOKINASE + GLUCOSE sur la RESPIRATION
ENDOGENE, en présence ou non de NAD⁺ ou NADP⁺ ajouté, en atmosphère
Air.

Conditions habituelles

() : le nombre des essais .

Tableau XXIX

	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M			
	0	+	0	+
Coenzyme	0	+	0	0
Malonate	0	0	0	+
Arsénite	0	0	0	+
	<u>SARCOSOMES NON LAVES</u>			
Q O ₂	31,9 ± 24,8 (2)	18,8 ± 0 (1)	0,9 (1)	76,3 ± 18 (5)
				40,1 (1)
				6,45 ± 0,05 (2)
	<u>SARCOSOMES LAVES</u>			
Q O ₂	3,9 ± 1,3 (2)	4,6 (1)	0 (1)	4 (1)
				4,1 (1)
				0,65 (2)
Inhibition par lavage	87 %		94. %	

Influence du LAVAGE des sarcosomes sur la respiration ENDOGENE en présence ou non de NAD⁺ ajouté, et son inhibition par le MALONATE et l'ARSENITE, en atmosphère Air et piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles sans substrat ajouté

Malonate : 7,5 . 10⁻⁴ M

Arsénite : 5.10⁻³ M

() : le nombre des essais.

3) Influence du lavage des sarcosomes sur l'oxydation du glutamate et son inhibition par le malonate et l'arsénite.

Le malonate et l'arsénite inhibent presque à 100 % l'oxydation du glutamate par des sarcosomes lavés, incubés en absence de NAD^+ (tableau XXX). Ces valeurs sont plus accentuées que celles observées avec des sarcosomes non lavés (89 % et 94 %).

Si on ajoute NAD^+ , l'augmentation du QO_2 est analogue à celle des sarcosomes non lavés.

En présence d'arsénite, NAD^+ augmente de 239 % la consommation d'oxygène, par rapport aux essais sans NAD^+ ; en ce qui concerne le malonate, l'augmentation est de 407 %.

Quand il n'y a pas de NAD^+ ajouté au milieu d'incubation, la transamination du glutamate, que les sarcosomes soient lavés ou non, est de 100 % (tableau XXXI). Par contre, en présence de NAD^+ , on ne constate pas, avec les mitochondries lavées, ni la diminution de la consommation de glutamate, ni l'inhibition de la transamination, observées avec des sarcosomes non lavés.

4) Influence du lavage des sarcosomes sur l'accumulation de NH_4^+ .

On peut tirer les conclusions suivantes du tableau XXXII :

- Avec des sarcosomes non lavés, il y a, lors de la respiration endogène, une accumulation de NH_4^+ non négligeable, avec et sans NAD^+ . Avec NADP^+ l'accumulation de NH_4^+ est nettement plus importante. L'addition de glutamate augmente les quantités de NH_4^+ dosées dans le cas de la respiration endogène.

- Si les sarcosomes sont lavés, la respiration endogène des sarcosomes ne s'accompagne d'aucune désamination, quand il n'y a pas NAD^+ dans le milieu d'incubation. NAD^+ et NADP^+ ajoutés font apparaître environ 1 μmole (pour 10 mg de protéines et par heure) de NH_4^+ . Les sarcosomes lavés oxydant du glutamate sans addition de NAD^+ , accumulent de l'ammoniac. En présence d'arsénite, la quantité de ce dernier n'est pas modifiée. Avec NAD^+ , l'arsénite augmente la quantité de NH_4^+ . NADP^+ fait accumuler beaucoup plus de NH_4^+ que NAD^+ , mais l'arsénite diminue cette quantité.

5) Influence du lavage des sarcosomes sur le métabolisme du glutamate et l'accumulation de NH_4^+ , en absence du piège hexokinase plus glucose.

Dans ces conditions (tableau XXXIII), on voit que le lavage des

Tableau XXX

Coenzyme	0			NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M		
Malonate	0	+	0	0	+	0
As O ₂ Na	0	0	+	0	0	+
N° des essais	1,	2	3	4	5	6
SARCOSOMES NON LAVES						
Q O ₂	87,5 ⁺ _{-11,4} (6)	9 ⁺ _{-1,4} (3)	5 ⁺ _{-0,2} (3)	105,7 ⁺ _{-7,5} (6)	25,7 ⁺ _{-0,8} (3)	9,9 ⁺ _{-0,4} (3)
Augmentation	20 %		185 %	98 %		
	par rapport		par rapport	par rapport		
	aux essais 1		aux essais 2	aux essais 3		
SARCOSOMES LAVES						
Q O ₂	91,9 ⁺ _{-12,2} (7)	1,4 ⁺ _{-0,5} (3)	1,65 ⁺ _{-0,65} (2)	114,8 ⁺ _{-12,6} (6)	7,1 ⁺ _{-1,4} (3)	5,6 ⁺ _{-0,5} (3)
Augmentation	24 %		407 %	239 %		
	par rapport		par rapport	par rapport		
	aux essais 1		aux essais 2	aux essais 3		

Etude de l'influence du LAVAGE des SARCOSOMES sur l'oxydation du GLUTA-MATE et son inhibition par le MALONATE et l'ARSENITE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté, en atmosphère Air et piège Hexokinase + Glucose .

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻² M, Malonate 0,75.10⁻³M,

As O₂ Na 5.10⁻³ M

Sarcosomes non lavés : 5,7⁺_{-0,4} mg. de protéines par essai
(7 déterminations)

Sarcosomes lavés : 4,5⁺_{-0,3} mg. de protéines par essai
(7 déterminations)

() le nombre des essais .

Tableau XXXI

	SARCOSOMES	NON LAVES	SARCOSOMES	LAVES
Coenzyme	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M
Δ Asp ^x	25,2 $\pm$ 4,2 (3)	16,8 $\pm$ 4,1 (3)	29,6 $\pm$ 6,6 (4)	34,5 $\pm$ 7,9 (4)
Δ Glu ^x	28,5 $\pm$ 2,1 (2)	22,8 $\pm$ 2,4 (3)	30,5 $\pm$ 5,8 (4)	35,8 $\pm$ 7 (4)
$\frac{\Delta \text{Asp}}{\Delta \text{Glu}}$	88 %	73 %	97 %	96 %

Influence du LAVAGE des sarcosomes sur l'oxydation du GLUTAMATE et la formation d'ASPARTATE, en présence ou non de NAD⁺ ajouté, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose .

^x Conditions habituelles : Glutamate 3.10⁻³ M .
 Δ Asp et Δ Glu exprimés respectivement
 en μ moles apparues et consommées par 10 mg.
 de protéines et par heure .

() : le nombre des essais .

Tableau XXXII

Coenzyme	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M
As O ₂ Na	0	+	0
SARCOSOMES. NON LAVES			
$\Delta_{\text{NH}_4^+}^{\times}$	Respiration		
	ENDOGENE		
	0, 9 $\pm$ 0, 2 (5)	1, 2 $\pm$ 0, 3 (3)	1, 3 $\pm$ 0, 1 (6)
Respiration GLUTAMATE 3.10 ⁻³ M			
$\Delta_{\text{NH}_4^+}$	1, 8 $\pm$ 0, 14 (4)	1, 8 $\pm$ 0, 4 (2)	2, 2 $\pm$ 0, 2 (2)
SARCOSOMES LAVES			
Respiration			
ENDOGENE			
0 (1)	1, 2 (1)	1, 55 $\pm$ 0, 45 (2)	0, 9 (1)
Respiration GLUTAMATE 3.10 ⁻³ M			
$\Delta_{\text{NH}_4^+}$	1 $\pm$ 0, 1 (3)	0, 8 $\pm$ 0 (2)	1, 3 $\pm$ 0, 14 (3)
		2, 7 $\pm$ 0, 25 (2)	5, 1 $\pm$ 0, 37 (3)
			3, 45 $\pm$ 0, 05 (2)

Influence du LAVAGE des sarcosomes sur la QUANTITE de NH₄⁺ formé lors de la respiration ENDOGENE et de la respiration en présence de GLUTAMATE, en présence ou non de NAD⁺ NADP⁺ ajouté, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles : Glutamate 3.10⁻³ M

$\times \Delta_{\text{NH}_4^+}$ exprimé en μ moles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.

() : le nombre des essais.

Tableau XXXIII

SARCOSOMES NON LAVES				SARCOSOMES LAVES			
Coenzyme	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	0	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	
Q O ₂	19,1 ± 3,1 (3)	30 ± 5 (2)	22,4 ± 4 (3)	24,8 ± 3,8 (3)	28,3 ± 3,7 (2)	34,8 ± 3,5 (5)	
Δ Asp ^x	6,1 ± 1,1 (6)	5,1 ± 1,1 (4)	8,6 ± 1,9 (5)	10,5 ± 3,8 (2)	9 (1)	10,25 ± 0,25 (2)	
$\frac{\Delta O}{\Delta Asp}$ xx	2,7 (3)	5 (2)	2,3 (3)	2,1 (3)	2,8 (1)	3 (5)	
Δ NH ₄ ⁺ xxx	0,2 ± 0,14 (5)	0,6 ± 0,1 (3)	0,7 ± 0,4 (7)	0,3 ± 0,17 (3)	1,2 ± 0,1 (2)	0,4 ± 0,2 (4)	

77

Etude de l'influence du LAVAGE sur l'oxydation du GLUTAMATE et la formation d'ASPARTATE, la formation de NH₄⁺, en ABSENCE du piège HEXOKINASE + GLUCOSE, en présence ou non de NAD⁺ ou NADP⁺ ajouté, en atmosphère Air.

Conditions habituelles : Glutamate 1.10⁻² M.

x Δ Asp exprimé en μmoles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.

xx Δ O exprimé en μ atomes d'oxygène consommés par essai et Δ Asp en μmoles apparues par essai.

xxx Δ NH₄⁺ exprimé en μmoles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.

() : le nombre des essais .

sarcosomes augmente légèrement le QO_2 et la formation d'aspartate par rapport aux résultats obtenus avec des sarcosomes non lavés. NAD^+ augmente le rapport $\frac{\Delta O}{\Delta Asp}$ de 85 % dans le cas des sarcosomes non lavés, de 33 % avec des sarcosomes lavés.

La quantité de NH_4^+ dosée est augmentée de 300 % quand il est additionné NAD^+ au milieu d'incubation des sarcosomes lavés avec du glutamate. Dans les mêmes conditions, $NADP^+$ n'affecte pas la quantité de NH_4^+ dosée sans addition de coenzyme.

L'addition, au milieu d'incubation de sarcosomes non lavés, de ADP plus phosphate augmente le QO_2 du glutamate par rapport aux mêmes essais en absence du piège hexokinase plus glucose. La quantité de NH_4^+ dosée est presque nulle sans addition de coenzyme, NAD^+ ajouté l'augmente légèrement plus que $NADP^+$ (tableau XXXIV).

Tableau XXXIV

Coenzyme	O	$NAD^+ 2 \cdot 10^{-3} M$	$NADP^+ 2 \cdot 10^{-3} M$
QO_2	$43,1 \pm 3,9$ (2)	$50,7 \pm 0,7$ (2)	47 ± 1 (3)
ΔNH_4^+	$-0,3 \pm 0,3$ (2)	$1 \pm 0,3$ (2)	$0,5 \pm 0,1$ (3)

Influence de l'addition de ADP + P_i sur la formation de NH_4^+ lors de l'oxydation du GLUTAMATE par des sarcosomes non lavés, en présence ou non de NAD^+ et $NADP^+$ ajouté, en atmosphère Air.

Conditions : Glutamate $1 \cdot 10^{-2} M$,
ADP $1 \cdot 10^{-3} M$, P_i $5 \cdot 10^{-3} M$.

ADP + P_i sont ajoutés au $t = 0$ des incubations au lieu du piège Hexokinase + Glucose.

Les sarcosomes sont récoltés en présence de saccharose 0,25 M.

() le nombre des essais

CHAPITRE IV

BILANS DE L'OXYDATION DU GLUTAMATE
AU NIVEAU DES SARCCSOMES DE COEUR
DE PORC

1) Influence de concentrations variables de glutamate ajouté sur le métabolisme de ce substrat.

Si l'on diminue la concentration du glutamate dans le milieu d'incubation des sarcosomes, les résultats montrent (tableau XXXV) que, l'augmentation du QO_2 par NAD^+ , les quantités d'aspartate et de NH_4^+ accumulés, ne sont pas modifiées.

Par contre, l'inhibition de l'oxydation du glutamate par le malonate semble plus importante à la concentration 3.10^{-3} M. A cette concentration, la consommation d'oxygène, en présence de malonate, augmente de 531 % quand on additionne NAD^+ au milieu d'incubation des sarcosomes. Dans les mêmes conditions, à la concentration en glutamate 1.10^{-3} M, l'augmentation n'est que de 182 %.

2) Test d'activité déshydrogénase glutamique des divers échantillons d'hexokinase utilisés.

Dans le tableau XXXVI sont présentés les résultats des tests effectués sur les différents échantillons d'hexokinase utilisés dans notre travail, incubés ici sans mitochondrie.

En absence de glutamate ajouté, l'hexokinase Seravac additionnée de NAD^+ ou $NADP^+$, provoque l'accumulation d'une quantité importante de NH_4^+ . Par ailleurs, cet enzyme est contaminé par des quantités non négligeables d'acides aminés. Si le glutamate est ajouté, la quantité de NH_4^+ en présence de $NADP^+$ augmente de 151 %.

Par contre, l'hexokinase Sigma, ne présente aucune différence, au point de vue NH_4^+ accumulé, avec les témoins effectués sans hexokinase, cet enzyme contient des traces d'acides aminés.

Tableau XXXV

Substrat	GLUTAMATE 1.10^{-2} M			GLUTAMATE 3.10^{-3} M		
Coenzyme	0	NAD ⁺ 2.10^{-3} M		0	NAD ⁺ 2.10^{-3} M	
Malonate	0	+	0	+	0	+
N° des essais	1	2	3	4	5	6
QO ₂	59 ± 1,5 (4)	4 ± 2 (4)	64 ± 2,5 (3)	11 ± 1,45 (4)	57 ± 6,3 (3)	2 ± 4,3 (1)
Augmentation	7 % par rapport aux essais 1		182 % par rapport aux essais 2		10 % par rapport aux essais 5	
Inhibition	93 % par rapport aux essais 1		83 % par rapport aux essais 3		97 % par rapport aux essais 5	
Δ Asp ^x	11 (2)	traces (1)	5 (1)	traces (1)	9 (2)	traces (1)
Δ NH ₄ ⁺ ^{xx}	1 ± 0 (2)	1,2 ± 0,1 (2)	1 ± 0,015 (2)	1,3 ± 0,03 (2)	traces (1)	traces (1)

Détermination du QO₂ du GLUTAMATE, de son inhibition par le malonate, de la formation d'aspartate et de NH₄⁺, en fonction de CONCENTRATIONS variables de glutamate, en atmosphère Air et en présence du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles :

^x Δ Asp exprimé en μmoles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.

^{xx} Δ NH₄⁺ exprimé en μmoles apparues par 10 mg. de protéines et par heure.

() : le nombre des essais.

Tableau XXXVI

		SANS SUBSTRAT				GLUTAMATE 1.10 ⁻² M			
Hexokinase	Coenzyme	P/O	QO ₂	ΔNH_4^+ x	A.A xx	P/O	QO ₂	ΔNH_4^+	A.A
0	0	0(1)	0	-0,08(1)	0(1)	0(1)	0	-0,06(1)	0(1)
	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	0(1)	0	-0,16(1)	0(1)	0(1)	0	0,04(1)	0(1)
	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	0(1)	0	-0,1(1)	0(1)	0(1)	0	0,04(1)	0(1)
SERAVAC	0	0(2)	0	-0,02(2)	0,3 μmoles Glu	0(2)	0	0,01(2)	0,3 à 0,5(2) μmoles
	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	0(2)	0	0,34(2)	Asp Ala	0(2)	0	0,18(2)	Asp Ala
	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	0(2)	0	0,33(2)	Glu - NH ₂ (2)	0(2)	0	0,83(2)	0,05 μmoles Glu - NH ₂
SIGMA	0	0(2)	0	0,15(2)	traces xxx Glu	0(2)	0	0,01(2)	traces Asp
	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	0(2)	0	0(2)	Asp Ala	0(2)	0	0(2)	Ala
	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	0(2)	0	-0,04(2)	Glu - NH ₂ (2)	0(2)	0	-0,05(2)	Glu - NH ₂ (2)

TEST d'ACTIVITE DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE des divers échantillons d'HEXOKINASE utilisés, incubés sans mitochondrie, en présence ou non de NAD⁺ et NADP⁺ ajouté .

Conditions habituelles - Temps d'incubation = 15 minutes .

x ΔNH_4^+ exprimé en μmoles apparues par essai.

xx A.A : acides aminés décelés chromatographiquement

xxx traces : quantités inférieures à 0,1 μmoles

Les quantités d'Hexokinase sont :

1 mg par essai pour Sigma

3 mg par essai pour Seravac .

() : le nombre des essais .

Le tableau XXXVII donne les résultats obtenus lorsque les échantillons d'hexokinase sont incubés en présence de sarcosomes.

On voit que sans substrat ajouté et sans hexokinase les QO_2 sont faibles et les quantités de NH_4^+ dosées insignifiantes. Avec l'hexokinase Seravac, les QO_2 augmentent normalement, avec et sans coenzyme. On note une quantité importante de NH_4^+ en présence de NAD^+ , quantité doublée en présence de $NADP^+$. A peu de choses près, les mêmes résultats sont observés, quant aux QO_2 , avec l'hexokinase Sigma. Les quantités de NH_4^+ , dans ce dernier cas, ne sont notables qu'en présence de $NADP^+$. Les acides aminés dosés représentent la somme des acides aminés endogènes des sarcosomes et des acides aminés provenant de l'hexokinase Seravac dans le cas de ce dernier échantillon.

En présence de glutamate ajouté, on voit surtout que les quantités de NH_4^+ dosées, avec les coenzymes et l'hexokinase Seravac, sont à peu près le double de celles dosées, dans les mêmes conditions, en présence d'hexokinase Sigma.

3) Bilan de l'oxydation du glutamate par des sarcosomes lavés et non lavés, en présence du piège hexokinase plus glucose.

a) Sarcosomes non lavés incubés en absence de substrat (tableau XXXVIII).

- QO_2

NAD^+ ajouté stimule fortement le QO_2 , $NADP^+$ beaucoup moins. Avec l'Arsénite, la quantité d'oxygène augmente de 114 % par addition de NAD^+ , 190 % par addition de $NADP^+$.

- NH_4^+

Les quantités dosées, en absence de coenzyme ajouté et en présence de NAD^+ , sont sensiblement identiques. L'arsénite ne modifie guère ces valeurs. En présence de $NADP^+$, elles sont augmentées de 145 % (essais 5 par rapport aux essais 1) et de 100 % environ en présence d'arsénite (essais 6 par rapport aux essais 2).

- Acides α cétoniques et acides aminés

Aucune accumulation d'acides α cétoniques n'est décelée. Les quantités d'acides aminés endogènes, très faibles dans le cas de cette préparation, ne sont pas sensiblement modifiées pendant l'incubation.

b) Sarcosomes non lavés incubés en présence de glutamate (tableau XXXIX).

- QO_2 : NAD^+ augmente le QO_2 de 14 %, $NADP^+$ a sensi-

Tableau XXXVII

		SANS SUBSTRAT				GLUTAMATE 1.10 ⁻² M			
Hexokinase	Coenzyme	P/O	Q O ₂	Δ NH ₄ ⁺ x	A.A. xx	P/O	Q O ₂	Δ NH ₄ ⁺	Δ A.A. xxx
0	0	0(1)	6, 9	0, 02(1)	0	0(1)	22, 2	0, 02 (2)	0, 95
	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	0(1)	21, 7	0, 03(1)	0	0(2)	36, 2	0, 07 (2)	1
	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	0(1)	6, 7	0, 04(1)	0	0(2)	25, 7	0, 05 (2)	0, 9
SERAVAC	0	1, 6(1)	16, 8	0, 2 (1)	0, 3 à 0, 5(2)	2, 6(2)	90, 4	0, 22 (2)	3, 3
	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	2, 35(2)	51, 2	0, 75(2)	µmoles	2, 3(2)	112, 1	0, 31 (2)	2, 3
	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	1, 25(2)	36, 3	1, 5 (2)	Glu Asp Ala Glu-NH ₂	2, 3(2)	116	1, 2 (2)	4, 2
SIGMA	0	0, 75(2)	13, 4	0, 1 (1)	traces (2)	2, 5(2)	92, 6	0, 32 (2)	4
	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M	2, 7 (2)	94, 1	0, 17 (2)	Glu Asp	2, 3(2)	110, 4	0, 19 (2)	2, 7
	NADP ⁺ 2.10 ⁻³ M	2, 5 (2)	30, 8	0, 6 (2)	Glu-NH ₂ Ala	2, 6(2)	100, 9	0, 67 (2)	2, 4

TEST D'ACTIVITE DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE des divers échantillons d'HEXOKINASE utilisés, incubés en présence de mitochondries, en présence ou non de NAD⁺ et NADP⁺ ajouté .

Conditions habituelles - Temps d'incubation = 15 minutes.

x Δ NH₄⁺ exprimé en µmoles apparues par essai.

xx A.A. : acides aminés décelés chromatographiquement.

xxx Δ A.A. : exprimé en µmoles d'acide aminé apparues par essai.

Les quantités d'hexokinase sont : 1 mg par essai pour Sigma et 3 mg par essai pour Seravac.

() : le nombre des essais.

Tableau XXXVIII

Substrat	0					
Coenzyme	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M					
As O ₂ Na	0	+	0	+	0	+
N° des essais	1	2	3	4	5	6
Q O ₂	5 ⁺ _{-2,15} (2)	2,2 ⁺ _{-0,15} (3)	39 ⁺ _{-3,1} (2)	4,7 ⁺ _{-1,4} (4)	24,3 (1)	6,2 ⁺ _{-0,35} (2)
Δ NH ₄ ⁺ x	1,3 (1)	1,2 ⁺ _{-0,3} (3)	1,55 ⁺ _{-0,25} (2)	1,1 ⁺ _{-0,22} (4)	3,2 (1)	2,3 ⁺ _{-0,1} (2)
Δ OKG xx	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)
Δ OAA xxx	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)
Glu xxxxx						
Δ Asp	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)
Glu-NH ₂						
Ala						

Bilan complet de la RESPIRATION ENDOGENE de SARCOSOMES de coeur de Porc NON LAVES , en présence ou non de NAD⁺ et NADP⁺ ajouté , en atmosphère Air et piège HEXOKINASE + GLUCOSE .

Les conditions et conventions sont valables pour l'ensemble des tableaux XXXVIII à XXXXV

Conditions habituelles

x Δ NH₄⁺ exprimé en μmoles apparues pour 10 mg. de protéines et par heure.

xx Δ OKG exprimé en μmoles d'acide α cétoglutarique apparues pour 10 mg de protéines et par heure.

xxxx Δ OAA exprimé en μmoles d'acide oxalacétique apparues pour 10 mg de protéines et par heure.

xxxxx Δ acides aminés exprimé en μmoles apparues pour 10 mg de protéines et par heure.

() : le nombre des essais .

Tableau XXXIX.

Substrat	GLUTAMATE					
Coenzyme	3. 10 ⁻³ M					
As O ₂ Na	0	+	NAD ⁺ 2. 10 ⁻³ M	+	NADP ⁺ 2. 10 ⁻³ M	+
N° des essais	1	2	3	4	5	6
Q O ₂	85,4 ± 21,6 (2)	3,5 ± 0,8 (4)	97,4 ± 20,4 (2)	8,8 ± 0,4 (4)	97,3 ± 18,3 (2)	6,2 ± 0,44 (4)
Δ NH ₄ ⁺	1,2 ± 0,2 (2)	0,4 ± 0,2 (4)	1,6 ± 0,2 (2)	1,75 ± 0,27 (4)	3,3 ± 0 (2)	3,3 ± 0,75 (4)
Δ x KG	0 (2)	0,1 ± 0 (4)	0 (2)	1,1 ± 0,05 (4)	0 (2)	0,45 ± 0,1 (4)
Δ OAA	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)
Δ Glu	22,5 ± 3,9 (2)	non mesurable	26,4 (1)	non mesurable	25,7 ± 8,8 (2)	non mesurable
Δ Asp	26 ± 4,9 (2)	0 (4)	12,5 ± 1,3 (2)	0 (4)	14,9 ± 3,8 (2)	0 (4)
Δ Glu-NH ₂ Ala	0 (2)	0 (4)	0 (2)	0 (4)	0 (2)	0 (4)

Bilan complet de l'oxydation du GLUTAMATE par des SARCOSOMES de coeur de Porc NON LAVES, en présence ou non de NAD⁺ et NADP⁺ ajouté, en atmosphère Air et piège HEXOKINASE + GLUCOSE.

blement le même effet. En présence d'arsénite, NAD^+ augmente la quantité d'oxygène de 151 %, NADP^+ de 82 %.

- NH_4^+

NAD^+ augmente la quantité de NH_4^+ accumulé de 33 %, NADP^+ de 175 %. Si l'arsénite est introduit dans le milieu, NH_4^+ accumulé est accru de 300 % par l'addition de NAD^+ , 700 % par celle de NADP^+ .

On peut soustraire, dans le cas où il n'y a pas d'arsénite, des quantités de NH_4^+ dosées, les quantités dosées en présence des substrats endogènes, ceci dans les cas où NAD^+ et NADP^+ sont ajoutés. (valeurs du tableau XXXVIII, essais 4 et 6, soustraites des valeurs du tableau XXXIX, essais 4 et 6). On obtient 0,65 μmole pour NAD^+ et 1 μmole pour NADP^+ .

- α -cétoglutarate.

S'il n'y a pas d'arsénite, il ne s'accumule en aucun cas de l'acide α -cétoglutarique. Les quantités dosées en présence d'arsénite montrent que NAD^+ multiplie par 11 la valeur obtenue sans addition de coenzyme, NADP^+ par 4,5.

Les rapports $\frac{\Delta \text{NH}_4^+}{\Delta \alpha \text{KG}}$ sont 0,6 en présence de NAD^+

et 2,2 en présence de NADP^+ .

- Oxalacétate

Il ne s'en accumule en aucun cas.

- Acides aminés.

La consommation de glutamate n'est pas significativement modifiée par l'addition de coenzyme. En présence d'arsénite, notre technique de dosage ne permet pas d'apprécier sensiblement la consommation du glutamate, compte tenu de la concentration initiale de ce substrat. Le pourcentage de transamination, égal à 115 % en absence de coenzyme ajouté, tombe à 47 % en présence de NAD^+ et 57 % en présence de NADP^+ . L'arsénite dans tous les cas, supprime la transamination. Les quantités de glutamine et d'alanine mesurées au temps zéro des incubations, ne sont pas affectées au cours de ces dernières.

c) Sarcosomes lavés incubés en absence de substrat (tableau XXXX)

- QO_2

Quelles que soient les conditions, le QO_2 est très faible. L'arsénite l'inhibe complètement en absence de coenzyme et ne l'affecte pas en présence de coenzymes ajoutés.

Tableau XXXX

Substrat	0					
Coenzyme	NAD ⁺ 2.10 ⁻³ M					
As O ₂ Na	0	+	0	+	0	+
N° des essais	1	2	3	4	5	6
Q O ₂	2,7 (1)	0 (1)	1,2 (1)	0,65 ± 0,65 (2)	5,6 (1)	4 ± 0,9 (2)
Δ NH ₄ ⁺	0 (1)	0 (1)	1,2 (1)	1,55 ± 0,45 (2)	0,9 (1)	1,2 ± 0,4 (2)
Σ Δ α KG	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)
Δ OAA	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)
Δ Glu	0	0	0	0	0	0
Δ Asp	0	0	0	0	0	0
Δ Glu-NH ₂	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)	(2)
Ala						

Bilan complet de la RESPIRATION ENDOGENE de SARCOSOMES de coeur de Porc LAVES, en présence ou non de NAD⁺ et NADP⁺ ajouté , en atmosphère Air et piège HEXOKINASE + GLUCOSE .

- NH_4^+

Les quantités sont nulles quand il n'y a pas de coenzyme ajouté au milieu d'incubation. Dans les autres cas, les quantités dosées ne sont pas très sensiblement modifiées par le changement des conditions expérimentales.

- Acides α -cétoniques et acides aminés.

Aucune trace d'acides α -cétoniques ou acides aminés n'est décelée.

d) Sarcosomes lavés incubés en présence de glutamate (tableau XXXXI)

- QO_2

NAD^+ augmente le QO_2 de 31 %, NADP^+ de 45 %. Avec l'arsénite, la quantité d'oxygène consommé est accrue de 263 % par l'addition de NAD^+ , de 81 % par l'addition de NADP^+ , par rapport aux mêmes essais sans coenzyme.

- NH_4^+

La quantité de NH_4^+ mesurée en absence de coenzyme, n'est pas modifiée par l'addition de NAD^+ et est augmentée de 300 % par l'addition de NADP^+ . En présence d'arsénite, la quantité de NH_4^+ est augmentée de 253 % par l'addition de NAD^+ , de 360 % par addition de NADP^+ . Si l'on soustrait des valeurs obtenues dans ces dernières conditions, les valeurs correspondantes provenant de la respiration endogène (valeurs du tableau XXXX, essais 2, 4 et 6 soustraites des valeurs du tableau XXXXI, essais 2, 4 et 6) on obtient :

0,75 μmole de NH_4^+ en absence de coenzyme ajouté

1,1 μmoles de NH_4^+ avec NAD^+ ajouté

2,25 μmoles de NH_4^+ avec NADP^+ .

- α -cétooglutarate.

Les quantités d' α -cétooglutarate sont sensiblement plus élevées que celles mesurées avec des sarcosomes non lavés (tableau XXXIX). En présence d'arsénite, une accumulation d' α -cétooglutarate est décelée même sans addition de coenzyme. NAD^+ et NADP^+ augmentent cette quantité.

Les rapports $\frac{\Delta \text{NH}_4^+}{\Delta \alpha \text{KG}}$ sont les suivants : 1,6 en absence de coenzyme, 0,92 en présence de NAD^+ et 2,4 en présence de NADP^+ .

- Oxalacétate

Il ne s'en accumule en aucun cas.

Tableau XXXXI

Substrat		GLUTAMATE 3.10^{-3} M					
Coenzyme	0	NAD ⁺ 2.10^{-3} M				NADP ⁺ 2.10^{-3} M	
As O ₂ Na	0	+	0	+	0	+	+
N° des essais	1	2	3	4	5	6	
Q O ₂	74,2 (1)	1,65 ± 0,65 (2)	97,4 (1)	6 ± 0,6 (2)	103 (1)	3 ± 0,5 (2)	
Δ NH ₄ ⁺	1,1 (1)	0,75 ± 0,05 (2)	1,1 (1)	2,65 ± 0,25 (2)	4,4 (1)	3,45 ± 0,05 (2)	
Δ x KG	6 (1)	0,45 ± 0,65 (2)	0 (1)	1,2 ± 0 (2)	0 (1)	0,95 ± 0,15 (2)	
Δ OAA	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)	
Δ Glu	23,8 (1)	non mesurable	25,5 (1)	non mesurable	26,3 (1)	non mesurable	
Δ Asp.	14,5 (1)	0 (2)	20,4 (1)	0 (2)	16,2 (1)	0 (2)	
Δ Glu-NH ₂ Ala	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)	

Bilan complet de l'oxydation du GLUTAMATE par des SARCOSOMES de coeur de Porc LAVES, en présence ou non de NAD⁺ et NADP⁺ ajouté, en atmosphère Air et piège HEXOKINASE + GLUCOSE.

- Acides aminés.

Les quantités de glutamate consommé et d'aspartate formé ne varient pas significativement d'une condition à l'autre. L'arsénite empêche la transamination, la consommation de glutamate n'est pas mesurable en sa présence. Il n'est décelé aucune trace de glutamine ou d'alanine.

4) Bilans de l'oxydation du glutamate par des sarcosomes lavés et non lavés, en absence du piège hexokinase plus glucose.

a) Sarcosomes non lavés incubés en présence de substrat (tableau XXXXII, essais 1, 2, 3 et 4)

- QO_2

NAD^+ accroît le QO_2 de 42 % (essais 3 par rapport aux essais 4). L'inhibition par l'arsénite, sans coenzyme ajouté, n'est que de 72 %. L'addition de NAD^+ , en présence de cet inhibiteur, diminue encore cette inhibition et augmente, dans ces conditions, la consommation d'oxygène de 87 %.

- NH_4^+

Les quantités dosées ne sont pas affectées par l'addition de NAD^+ . L'arsénite les augmente de façon semblable avec et sans NAD^+ . Le tableau XXXXIII, montre que les quantités de NH_4^+ provenant de la respiration endogène sont très faibles, même en présence de coenzyme ajouté.

Tableau XXXXIII

Coenzyme	O	$NAD^+ 2.10^{-3}M$	$NADP^+ 2.10^{-3}M$
$\Delta NH_4^+ \times$	$0,15 \pm 0,09$ (2)	$0,21 \pm 0,9$ (2)	$0,3 \pm 0,24$ (2)

Dosage de NH_4^+ formé lors de la RESPIRATION ENDOGENE de sarcosomes, en ABSENCE du piège Hexokinase + Glucose, en présence ou non de NAD^+ et $NADP^+$ ajouté et en atmosphère Air.

Conditions habituelles

$\times \Delta NH_4^+$ exprimé en μ moles de NH_4^+ formé pour 10 mg. de protéines et par heure.

() le nombre des essais.

Tableau XXXXII

Substrat		GLUTAMATE		3. 10 ⁻³ M	
Sarcosomes		NON		LAVES	
Coenzyme		0		NAD ⁺ 2. 10 ⁻³ M	
As O ₂ Na		0		+	
N° des essais		1	2	3	4
Q O ₂	17,5 (1)	4,9 ⁺ ₀ (2)	25 (1)	9,2 ⁺ _{0,9} (2)	20 (1)
Δ NH ₄ ⁺	0,35 (1)	0,95 ⁺ _{0,15} (2)	0,4 (1)	0,8 ⁺ _{0,16} (2)	0,3 (1)
Δ XKG	0,17 (1)	0,2 ⁺ _{0,08} (2)	0,3 (1)	0,9 ⁺ _{0,02} (2)	0 (1)
Δ Glu	4,2 (1)	non mesurable	5,6 (1)	non mesurable	6,8 (1)
Δ Asp	3,2 (1)	0 (2)	2 (1)	0 (2)	6,7 (1)
Δ Glu - NH ₂ Ala	0 (1)	0 (2)	0 (1)	0 (2)	0 (1)

Bilan complet de l'oxydation du GLUTAMATE par des SARCOSOMES de coeur de Porc LAVES et NON LAVES, en présence ou non de NAD⁺ et NADP⁺ ajouté, en atmosphère Air et en Absence du piège Hexokinase + Glucose.

- α -cétooglutarate.

On note une légère accumulation de l' α -cétooglutarate même quand il n'y a pas d'arsénite. NAD^+ double cette quantité. L'arsénite ne modifie pas la valeur obtenue sans addition de coenzyme et multiplie par 3 celle obtenue lorsqu'il y a NAD^+ dans le milieu d'incubation.

Les rapports $\frac{\Delta \text{NH}_4}{\Delta \alpha \text{KG}}$ sont égaux à 2 (essais 1) et 1,3 (essais 3), et à 4,5 (essais 2) et 0,9 (essais 3) en présence d'arsénite.

- pyruvate et oxalacétate (tableau XXXXIII bis)

Les résultats montrent qu'il ne s'en accumule pas.

Tableau XXXXIII bis

Coenzyme	O	$\text{NAD}^+ 2.10^{-3} \text{ M}$	$\text{NADP}^+ 2.10^{-3} \text{ M}$
Pyruvate	0 (2)	0 (2)	0 (2)
Oxalacétate	0 (2)	0 (2)	0 (2)

Dosage de l'OXALACETATE et du PYRUVATE lors de l'oxydation du GLUTAMATE par des sarcosomes non lavés, en présence ou non de NAD^+ ou NADP^+ ajouté, en atmosphère Air et en ABSENCE du piège Hexokinase + Glucose.

Conditions habituelles :

Glutamate 1.10^{-2} M

() le nombre des essais.

- Acides aminés

La consommation de glutamate est augmentée par l'addition de NAD^+ . En présence d'arsénite cette consommation n'est pas mesurable. La transamination est de 77 % en absence de NAD^+ ajouté et de 35 % en sa présence.

b) Sarcosomes lavés incubés en présence de substrat (tableau XXXXII, essais 5, 6, 7 et 8).

- QO_2

NAD^+ augmente le QC_2 de 23 % (essais 6 par rapport aux essais 5). L'inhibition par l'arsénite est de 89 %. En présence de cet inhibiteur, NAD^+ augmente la consommation d'oxygène de 193 % (essais 8 par rapport aux essais 6).

- NH_4^+

Les quantités dosées, en absence de coenzyme ajouté, sont identiques à celles des sarcosomes non lavés s'il n'y a pas d'arsénite (essais 5 et essais 1), un peu inférieures quand il y a de l'arsénite (essais 6 et essais 2). En présence de NAD^+ , avec et sans arsénite, les quantités de NH_4^+ dosées sont beaucoup plus importantes que celles dosées dans le cas des sarcosomes non lavés (essais 7 et 3, essais 8 et 4).

- α -cétoglutarate

Ce substrat s'accumule uniquement en présence de NAD^+ . L'arsénite multiplie par 3 la quantité dosée en absence de cet inhibiteur.

Les rapports $\frac{\Delta NH_4^+}{\Delta \alpha KG}$ sont égaux à 3,2 en absence d'arsénite et 1,45 en sa présence.

- Acides aminés

La consommation de glutamate est augmentée par l'addition de NAD^+ et n'est pas mesurable quand il y a de l'arsénite. Dans les deux cas, avec et sans NAD^+ , la transamination est de l'ordre de 100 %. Il ne s'accumule ni glutamine, ni alanine.

5) Bilan de l'oxydation du glutamate par des mitochondries de foie de Rat lavées, incubées en présence du piège Hexokinase plus Glucose.

(tableaux XXXXIV et XXXXV)

Nous avons effectué ce bilan à titre de comparaison. Quand il n'y a pas de substrat, les QO_2 mesurés sont très faibles quelles que soient les conditions.

Sans coenzyme ajouté, la quantité de NH_4^+ dosé est faible, nulle lorsqu'il y a de l'arsénite. Le NAD^+ ajouté augmente cette quantité de 125 %, (essais 3 par rapport aux essais 1), plus encore s'il y a de l'arsénite. $NADP$ provoque la formation d'une forte quantité de NH_4^+ , un peu moins élevée en présence d'arsénite.

On ne note l'accumulation d'aucun acide aminé ou acide α -cétonique.

Tableau XXXXIV

Substrat	0					
Coenzyme	0					
As O ₂ Na	,0					
N° des essais	1	2	3	4	5	6
Q O ₂	2,45 $\pm$ 0 (2)	1,1 $\pm$ 0,5 (2)	1,8 $\pm$ 0,22 (3)	1,6 $\pm$ 0,17 (3)	2,5 $\pm$ 1 (3)	1,7 $\pm$ 1,4 (3)
Δ NH ₄ ⁺	0,4 $\pm$ 0,04 (2)	-0,12 $\pm$ 0,06 (2)	0,9 $\pm$ 0,2 (3)	1,2 $\pm$ 0,12 (3)	4,3 $\pm$ 0,1 (3)	3 $\pm$ 0,1 (3)
Δ $\propto$ KG	0					
Δ OAA	0					
Glu	0					
Asp	0					
Glu-NH ₂	0					
Ala	0					

Bilan complet de la respiration ENDOGENE de MITOCHONDRIES de FOIE de Rat LAVÉES, en présence ou non de NAD⁺ et NADP⁺ ajouté, en atmosphère Air et piège Hexokinase + Glucose.

Tableau XXXV

Substrat	GLUTAMATE				3. 10 ⁻³ M				
Coenzyme	0				NAD ⁺ 2. 10 ⁻³ M	NADP ⁺ 2. 10 ⁻³ M			
As O ₂ Na	0	+		0	+	0	+		+
N° des essais	1	2		3	4	5	6		
Q O ₂	55, 3 $\pm$ 0, 8 (2)	2, 7 $\pm$ 0, 3 (2)		66 $\pm$ 1 (3)	9, 6 $\pm$ 0, 75 (3)	54, 2 $\pm$ 0, 5 (2)	1, 25 $\pm$ 0, 4 (3)		
$\Delta_{\text{NH}_4^+}$	2, 3 $\pm$ 0 (2)	1, 9 $\pm$ 0, 2 (2)		5, 4 $\pm$ 0, 3 (3)	7, 6 $\pm$ 0, 5 (3)	6 $\pm$ 0, 45 (3)	4 $\pm$ 0, 17 (3)		
$\Delta \propto \text{KG}$	0 (3)	1, 5 $\pm$ 0 (2)		0 (3)	4, 8 $\pm$ 0, 3 (3)	0 (3)	2, 6 $\pm$ 0, 09 (3)		
Δ_{Glu}	15, 7 $\pm$ 1, 4 (2)	non dosable		25, 2 $\pm$ 1, 3 (3)	8, 4 $\pm$ 0 (2)	16, 6 $\pm$ 0, 6 (2)	non dosable		
Δ_{Asp}	19, 9 $\pm$ 3, 45 (2)	0 (2)		19, 5 $\pm$ 1, 3 (3)	0 (2)	21, 7 $\pm$ 0 (2)	0 (3)		
Δ_{Ala}	0 (2)	0 (2)		0 (3)	0 (2)	0 (2)	0 (3)		
$\Delta_{\text{Glu-NH}_2}$									

Bilan complet de l'oxydation du GLUTAMATE par des MITOCHONDRIES de FOIE de Rat, en présence ou non de NAD^+ Et NADP^+ ajouté, en atmosphère Air et piège Hexokinase + Glucose.

En présence de Glutamate 3.10^{-3} M le QO_2 est augmenté de 19 % par l'addition de NAD^+ , $NADP^+$ ne le modifie pas de façon sensible. En présence d'arsénite le QO_2 du Glu est inhibé à 95 % ; si l'on ajoute NAD^+ la consommation d'oxygène augmente de 255 %, en présence de $NADP^+$ l'inhibition du QO_2 est de 97 %.

Il ne s'accumule en aucun cas de l' α -cétooglutarate quand il n'y a pas d'arsénite. En présence d'arsénite, le NAD^+ augmente de 220 % la quantité d' α -cétooglutarate dosé sans addition de coenzyme, mais $NADP^+$ la diminue de 60 %.

Si l'on soustrait les quantités de NH_4^+ dosé lors de la respiration endogène en présence d'arsénite (tableau XXXXIV, essais 2, 4 et 6) des quantités dosées en présence de substrat (tableau XXXXV, essais 2, 4 et 6) on obtient : 2 pour les essais sans coenzyme ajouté, 6,4 pour NAD^+ ajouté et 1 pour $NADP^+$ ajouté, les rapports $\mu\text{moles } NH_4^+$ sur $\mu\text{moles } \alpha\text{KG}$ deviennent, dans ces conditions, 1,33 pour les essais sans coenzyme ajouté, 1,33 avec NAD^+ et 1,66 avec $NADP^+$.

NAD^+ augmente la consommation de glutamate de 60 %, alors que $NADP^+$ ne l'affecte pas sensiblement. Comme la quantité d'Asp reste constante, on voit que NAD^+ diminue la transamination. En présence d'arsénite, on mesure avec NAD^+ une nette consommation de glutamate, mais en aucun cas il n'est décelé de l'aspartate. Il ne se forme de la glutamine et de l'alanine, en aucun cas.

RESUME

CONCLUSIONS

L'OXYDATION DU GLUTAMATE PAR DES SARCOSES DE COEUR DE PORC, PAUVRES EN NAD, S'EFFECTUE PAR TRANSAMINATION.

Cette conclusion s'appuie sur les résultats suivants :

Les sarcosomes préparés sont pauvres en NAD ($\text{NAD}^+ + \text{NADH}$) (tableau I). L'oxydation du glutamate s'accompagne d'une formation d'aspartate. Le malonate et l'arsénite inhibent complètement le QO_2 et la formation d'aspartate (tableaux II, III et VII). En absence de ces inhibiteurs, l'oxydation du glutamate se fait donc essentiellement par transamination avec l'oxalacétate (E.C. 2.6.1.1). Les rapports $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Asp}}$ et $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Glu}}$ sont voisins de

3 (tableaux II et V). L'addition de fumarate au milieu d'incubation des sarcosomes, contenant du glutamate et du malonate, rétablit la formation d'aspartate et le QO_2 du glutamate (tableaux II et XI).

L'ADDITION DE NAD^+ A DES SARCOSES DE COEUR DE PORC STIMULE LA DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE AUX DEPENS DE LA TRANSAMINATION.

Cette conclusion est étayée par les faits suivants :

NAD^+ ajouté augmente le QO_2 de 21 % (tableau III), sans diminuer le P/O du glutamate (tableau IX). Le pourcentage de transamination est diminué et les rapports $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Asp}}$ et $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Glu}}$ augmentés par

l'addition de ce coenzyme. Il ne s'accumule ni glutamine, ni alanine, ni acides α -cétoniques (α -cétoglutarate, oxalacétate et pyruvate). La stimulation de la déshydrogénase glutamique (E.C. 1.4.1.2), par addition de NAD^+ , est corroborée par l'augmentation de la consommation d'oxygène observée lorsque la transamination du glutamate est bloquée par l'emploi

de différents inhibiteurs du cycle de Krebs (arsénite, malonate, monofluorooxalacétate) ou de la transaminase (difluorooxalacétate) (tableau III, VII, XV, XVI, XVIII et XIX). Les résultats obtenus (tableau XI) lorsque le fumarate est ajouté au milieu d'incubation des sarcosomes, contenant du glutamate, du malonate, et NAD^+ , montrent que, dans ces conditions, ce dernier stimule à la fois la déshydrogénase glutamique et la déshydrogénase malique (E.C.1.1.1. 37). La forte quantité d'aspartate dosé n'est pas due à une aspartase (E.C.4.3.1.1.).

L'emploi d'oxygène pur accroît fortement l'activité de la déshydrogénase glutamique, même quand il n'y a pas de NAD^+ ajouté au milieu (tableau IV). Simultanément, la quantité de glutamate oxydée par transamination est augmentée (tableaux VI et VII).

Les conclusions précédentes sont celles provenant d'observations effectuées dans des conditions d'incubation où l'ATP est piégé au fur et à mesure de sa formation. En absence du piège hexokinase plus glucose, les résultats inclinent à penser que, en valeur relative, une quantité plus importante de glutamate, peut s'oxyder par la déshydrogénase glutamique (tableau VIII).

LE FONCTIONNEMENT DE LA DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE EST PROUVE PAR LES DETERMINATIONS QUANTITATIVES DE NADH , NH_4^+ ET α -CETOGLUTARATE.

La méthode de STRECKER (tableau XX) permet d'accumuler, jusqu'à l'état d'équilibre, $\text{NADH} + \text{H}^+$.

NAD^+ ajouté au milieu d'incubation des sarcosomes augmente la quantité de NH_4^+ quand le glutamate est oxydé. En présence de malonate, cette quantité est encore augmentée (tableau XXI). En absence du piège hexokinase plus glucose, les quantités de NH_4^+ dosées (tableau XXXXII) traduisent le fonctionnement de l'enzyme.

Dans tous les cas, c'est en présence d'arsénite que l'existence et le fonctionnement de la déshydrogénase glutamique sont prouvés de façon indubitables : NH_4^+ et α -cétoglutarate sont dosés et les rapports

$\frac{\text{NH}_4^+}{\alpha \text{ KG}}$ sont légèrement supérieurs à 1 (tableaux XXXVIII à XXXXII).

LA DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE N'EST PAS SPECIFIQUE DE NADP^+ ET FAIT PARTIE INTEGRANTE DES STRUCTURES MITOCHONDRIALES.

En effet, NADP^+ additionné au milieu d'incubation des sarcosomes stimule peu le QO_2 du glutamate. En présence d'arsénite, l'augmentation de la consommation d'oxygène est nettement inférieure à celle observée avec NAD^+ . L'augmentation de la consommation d'oxygène en présence de malonate, tout aussi importante que celle de NAD^+ prouve que NADP^+ pénètre dans la mitochondrie et stimule l'activité de la déshydrogénase α -cétoglutarique (tableau VIII).

Par contre, l'addition de NADP^+ a pour effet d'accumuler 3 à 4 fois plus de NH_4^+ que NAD^+ , quand les sarcosomes sont incubés avec du glutamate. En présence de malonate, cette quantité n'est pas modifiée, l'arsénite la diminue. Mais les quantités d' α -cétoglutarate dosées avec ce dernier inhibiteur sont très inférieures aux quantités de NH_4^+ dosées dans les mêmes conditions et inférieures aux quantités d' α -cétoglutarate dosées avec NAD^+ ajouté (tableaux XXIII, XXXII, XXXVIII et XXXIX).

L'addition de NADP^+ au milieu d'incubation des sarcosomes fait apparaître de fortes quantités de NH_4^+ indépendantes du fonctionnement de la déshydrogénase glutamique. NH_4^+ ne provient pas de la désamination de l'ADP (tableau XXXIV).

Dans les mitochondries de foie, l'activité de la déshydrogénase glutamique est plus élevée que dans les sarcosomes de coeur de Porc. L'enzyme est, *in vitro*, spécifique de NAD^+ . L'addition de NADP^+ , à ces mitochondries stimule une désaminase sans activer la déshydrogénase glutamique (tableaux XXXIV et XXXV).

La localisation de la déshydrogénase glutamique, dans les structures sarcosomiques, résulte de l'ensemble des observations effectuées avec des sarcosomes lavés. Par addition de NAD^+ des effets, identiques à ceux des sarcosomes non lavés, sont obtenus : consommation d'oxygène augmentée, en présence ou non des inhibiteurs, (tableaux XXX et XXXI), accumulation de NH_4^+ (tableaux XXXII à XXXIV), rapports $\frac{\Delta \text{NH}_4^+}{\Delta \alpha \text{KG}}$ voisins de 1 (tableaux XXXX, XXXXI et XXXXIII).

EN PLUS DE LA DISPONIBILITE EN NAD^+ , DIFFERENTS FACTEURS CONTROLENT L'OXYDATION DU GLUTAMATE.

La respiration endogène, fortement augmentée par l'addition de NAD^+ au milieu d'incubation des sarcosomes, n'empêche pas la pénétration et l'oxydation du glutamate quand il est ajouté. En effet, le malonate inhibe peu la respiration endogène et complètement celle mesurée en présence de glutamate. (tableau XXV). La respiration endogène augmente la quantité de NH_4^+ accumulée au cours de l'oxydation du glutamate. Ce NH_4^+ peut provenir surtout de l'hydrolyse de la glutamine endogène (tableaux XXV à XXIX).

Le lavage des sarcosomes supprime la respiration endogène. A condition que l'on fournisse NAD^+ aux sarcosomes, l'activité de la déshydrogénase glutamique n'est pas modifiée par lavage de ces particules. Par contre, le contrôle de la transamination par NAD^+ disparaît par lavage des sarcosomes (tableaux XXX et XXXI).

La diminution de la concentration de glutamate, dans le milieu d'incubation des sarcosomes, semble augmenter, en valeur relative, la quantité de glutamate oxydé par la déshydrogénase glutamique, en présence de NAD^+ et malonate (tableau XXXV).

Contrôle des enzymes utilisés : les échantillons d'hexokinase utilisés, préparés industriellement, à partir d'extraits de levure, peuvent être contaminés par une déshydrogénase glutamique spécifique de NADP^+ (tableaux XXXVI et XXXVII).

CONCLUSION GENERALE

L'oxydation du glutamate au niveau des sarcosomes de coeur de Porc s'effectue par transamination et désamination oxydatives. La déshydrogénase glutamique est un enzyme régulateur dont le fonctionnement ne peut être mesuré, *in vitro*, que dans des conditions aussi près que possible des conditions physiologiques (disponibilité en NAD^+ , substrats endogènes, vitesse des électrons au niveau de la chaîne respiratoire).

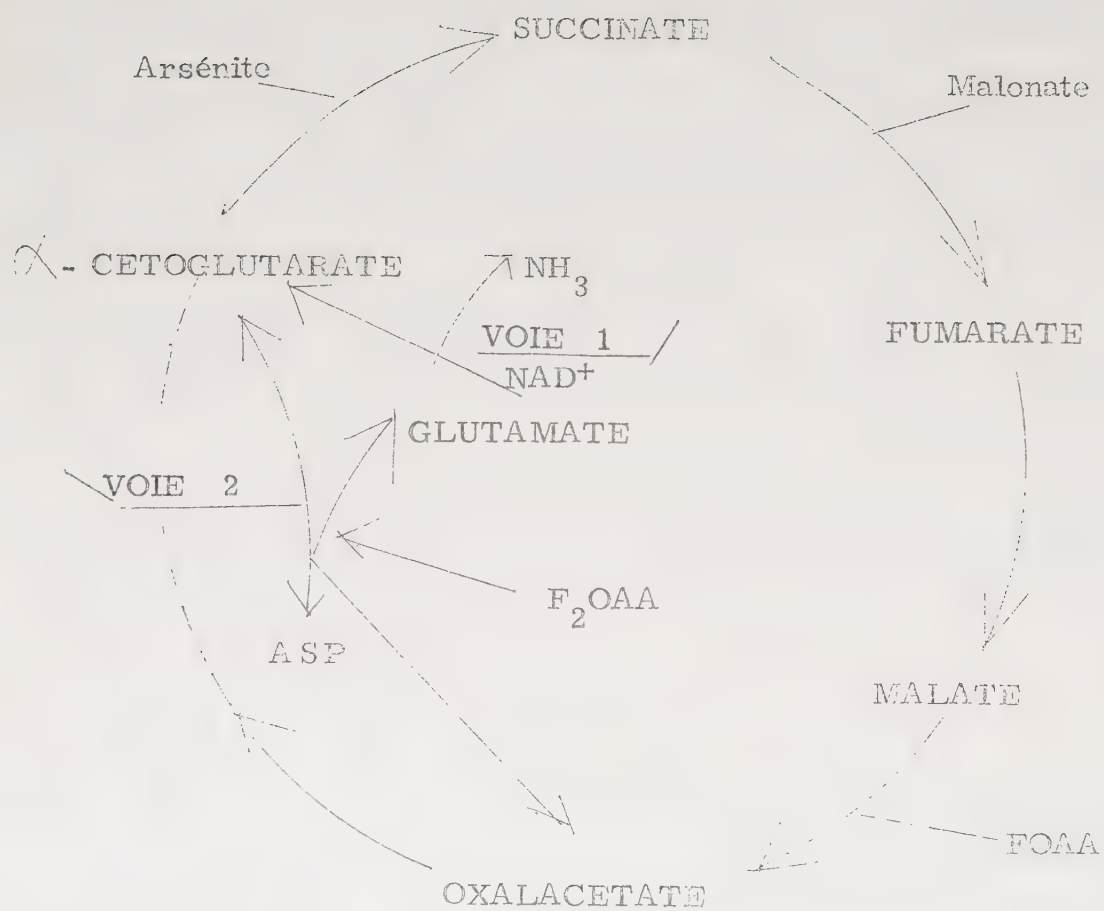


Schéma 4

DISCUSSION

Les résultats et conclusions précédentes appellent les commentaires suivants :

L'OXYDATION DU GLUTAMATE EN MILIEU PAUVRE EN NAD.

Nos résultats montrent que l'oxydation du glutamate par des sarcosomes de coeur de Porc, pauvres en NAD, s'effectue essentiellement par transamination.

Si le glutamate s'oxydait uniquement par la déshydrogénase glutamique (E.C. 1.4.1.2), comme on l'avait cru tout d'abord, on comprendrait mal que le malonate (inhibiteur compétitif de la succinodéshydrogénase, E.C. 1.3.99.1) puisse inhiber le QO_2 à près de 100 % (voie 1, schéma 4).

Par contre, il est facile d'interpréter ce dernier résultat à la lumière de la 2e voie d'oxydation du glutamate (schéma 4). Dans ce cas-là, le glutamate est transaminé en présence d'oxalacétate pour donner de l' α -céto-glutarate, ensuite oxydé par le cycle de KREBS, et de l'aspartate (E.C. 2.6.1.1.). Il se forme autant d'aspartate qu'il y a de glutamate consommé. Dans ces conditions, et nos résultats le confirment, les rapports $\frac{\Delta O}{\Delta Asp}$ et $\frac{\Delta O}{\Delta Glu}$ sont

voisins de 3. P. BORST (7) a mesuré des rapports identiques avec les mitochondries de foie.

Mais alors, la vitesse de transamination dépend de la quantité d'oxalacétate disponible à tout moment, et, par conséquent, du fonctionnement du cycle de KREBS. Le malonate empêche toute formation d'oxalacétate, et la transamination s'arrête. L'addition du fumarate dans le milieu d'incubation des sarcosomes, contenant du glutamate et du malonate, rétablit la transamination à près de 100 %. Le fumarate assure, en effet, la formation d'oxalacétate en présence de malonate ou non.

Ce mécanisme est corroboré par les résultats obtenus en présence d'arsénite. Cet inhibiteur de la déshydrogénase α -céto-glutarique inhibe complètement le QO_2 et la transamination du glutamate.

Un tel mécanisme explique par ailleurs pourquoi l'oxydation d' α -céto-glutarate ajouté au milieu d'incubation des sarcosomes n'est inhibée qu'à 50-60 % (26) par le malonate. Ce substrat s'oxyde par la déshydrogénase α -céto-glutarique (E.C. 1.2.4.2) dont le fonctionnement n'est pas soumis à la disponibilité en oxalacétate.

KREBS et BELLAMY (48) ont été les premiers à analyser le caractère général de ce cycle de transamination du glutamate dans les tissus des mammifères. Par la suite, un résultat analogue au nôtre a été trouvé par d'autres auteurs, travaillant sur des homogénats et des coupes de cerveau (33), des mitochondries de foie (2) (7) (13), de glande mammaire (42), de cerveau (2) et de muscle cardiaque (8) (32).

EFFETS DE L'ADDITION DE NAD^+ DANS LE MILIEU D'INCUBATION DES SARCOSOMES SUR LA CONSOMMATION D'OXYGÈNE.

La possibilité pour les mitochondries de perdre une partie de leur NAD est connue (39). Le NAD dosé ($\text{NAD}^+ + \text{NADH}$) dans des sarcosomes de coeur de Porc, préparés selon nos conditions, représente 3 à 5 % de la quantité totale de NAD habituellement dosé dans le muscle cardiaque (27, 41). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres auteurs (71). Si l'on tient compte des quantités de cytochrome a et de coenzyme Q dosées au niveau des sarcosomes de coeur de boeuf (57), on constate que le NAD dosé est du même ordre de grandeur ; il s'agit donc, vraisemblablement, du NAD lié à la chaîne respiratoire. La compartimentation de ce nucléotide dans la mitochondrie (55) nous permet de penser qu'une carence en nucléotide libre doit se faire sentir au niveau des déshydrogénases localisées dans l'espace intermembranaire des crêtes mitochondriales. Un enzyme comme la déshydrogénase glutamique peut souffrir d'une telle carence.

D'autre part, la concentration physiologique moyenne en NAD est d'environ $0,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ dans la cellule (41). On peut donc étudier, in vitro, l'influence d'une telle concentration sur le fonctionnement des déshydrogénases localisées dans les mitochondries. L'addition de NAD^+ dans le milieu d'incubation des mitochondries de foie (31) (65) (66) et de coeur (56) a montré que, dès cette concentration, ce coenzyme pénétrait dans celles-ci.

En ce qui nous concerne, nous avons observé les effets métaboliques de l'addition de NAD^+ dès la concentration finale $0,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Cependant pour pallier les différences de perméabilité observées d'une préparation de sarcosomes à l'autre, une grande partie de notre travail a été effectuée à la concentration $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

D'autres auteurs, postérieurement à nos premiers résultats, ont étudié l'influence de NAD^+ sur le métabolisme mitochondrial d'autres organes. Ils ont aussi adopté des concentrations finales allant de $0,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ à $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (2) (17) (18) (52) (62), parfois $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (67).

Ce NAD^+ ajouté modifie-t-il la perméabilité mitochondriale ? A la concentration 8.10^{-3} M en NAD^+ , un auteur (1) a observé un gonflement des sarcosomes de coeur. Pour notre part, nos résultats nous ont montré que l'addition de NAD^+ 2.10^{-3} M modifie la perméabilité mitochondriale vis à vis du glutamate en fonction des conditions d'incubation. En présence du piège hexokinase plus glucose, qui maintient constante, dans le milieu d'incubation, la concentration en ADP, l'addition de NAD^+ diminue la consommation de glutamate. En absence du piège, donc en présence d'ATP, l'addition de NAD tend plutôt à augmenter la consommation de glutamate.

L'effet de l'addition de NAD^+ sur le métabolisme mitochondrial résulte-t-il, comme le suggèrent SLATER et coll. (17) à propos des mitochondries de foie, d'une augmentation de la perméabilité liée à une altération irréversible des structures mitochondriales. Dans notre cas, le P/O du glutamate, déterminé en absence et en présence de NAD^+ ajouté, est voisin de 3. Ceci montre bien que structures et fonctions de nos particules sont conservées dans leur intégralité au cours de la préparation, et que, par ailleurs, l'addition de NAD^+ ne les affecte pas. De plus, l'excellent état des structures de nos mitochondries est confirmé par un ensemble d'études du contrôle respiratoire (effets comparés de l'ADP et du 2,4 dinitrophénol) effectuées au polarographe par Catherine GODINOT (28).

Quoiqu'il en soit, l'augmentation du QO_2 du glutamate par addition de NAD^+ 2.10^{-3} M ne peut pas s'interpréter par une augmentation de la perméabilité des sarcosomes vis à vis de ce substrat, oxydé ensuite par transamination. En présence du piège hexokinase plus glucose, ou la quantité de glutamate oxydé demeure constante, ou bien elle diminue quand on ajoute NAD^+ . En absence du piège, la quantité de glutamate oxydé augmente, mais la transamination diminue.

Pour nous, cette augmentation de la consommation d'oxygène, provient d'une quantité supplémentaire de $\text{NADH} + \text{H}^+$ réoxydée au niveau de la chaîne respiratoire. On peut facilement interpréter cette augmentation du QO_2 si l'on considère la première voie d'oxydation du glutamate (schéma 4). Si le glutamate est oxydé par cette voie, il se transforme en α -cétooglutarate grâce à une déshydrogénase dont le coenzyme est NAD^+ ou NADP^+ (E.C. 1.4.1.2).

L' α -cétooglutarate formé suit alors la voie normale du cycle de Krebs. Il faut noter que, dans ce cas là, pour une même quantité de glutamate oxydé, il y a plus d'oxygène consommé que par la voie 2. A la limite, quand tout le glutamate passe par cette voie, la quantité d'oxygène correspondant au fonctionnement de la déshydrogénase glutamique est égale au $\frac{1}{9}$ de la quantité totale.

De deux choses l'une : ou NAD^+ stimule uniquement la déshydrogénase glutamique, ou ce coenzyme stimule l'ensemble des déshy-

drogénases du cycle de KREBS dont il est spécifique. Dans la première des hypothèses, il devrait s'accumuler de l'acide α -céto-glutarique ou de l'oxalacétate.

Or nos résultats montrent qu'il n'en est rien. Donc, l'addition de ce coenzyme stimule d'une façon générale les déshydrogénases à NAD^+ .

En présence de malonate, NAD^+ ajouté stimule la déshydrogénase glutamique et la déshydrogénase α -céto-glutarique. L'utilisation de l'arsénite prouve la sensibilité de la déshydrogénase glutamique à l'addition de NAD^+ . De même, la sensibilité de la déshydrogénase malique (E.C. 1.1.37) à l'addition de NAD^+ est soulignée par la stimulation de l'oxydation du fumarate. Ce dernier résultat a été largement confirmé par HO CHONG HONG (37). Comme l'ont montré les travaux de OCHOA et Coll. (73), la stimulation de la déshydrogénase malique par NAD^+ favorise fortement la condensation de l'acétyl CoA et de l'oxalacétate (E.C.4.1.3.7). Enfin la déshydrogénase isocitrique peut aussi être stimulée (29).

LES EFFETS DE L'ADDITION DE NAD^+ SUR LA TRANSAMINATION DU GLUTAMATE.

Si l'addition de NAD^+ stimule la déshydrogénase glutamique aux dépens de la transamination, on peut s'attendre à trois possibilités :

a) l'addition de NAD^+ augmente la consommation du glutamate sans modifier la quantité d'aspartate formé. En d'autres termes, cela signifie que la déshydrogénase glutamique oxyde une quantité supplémentaire de glutamate, sans affecter la quantité de ce substrat habituellement oxydé par transamination. Nous avons obtenu un tel résultat avec les mitochondries de foie lavées.

b) L'addition de NAD^+ augmente la consommation de glutamate et diminue la quantité d'aspartate accumulée. C'est le cas observé avec des sarcosomes de coeur de Porc non lavés et en absence du piège hexokinase plus glucose. Comme, dans ce cas-là, la consommation d'oxygène, les rapports $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Asp}}$ et $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Glu}}$ sont augmentés, le premier rapport plus que le second, on peut conclure que non seulement la déshydrogénase glutamique contrôle l'entrée du glutamate, mais encore est stimulée aux dépens de la transamination.

c) L'addition de NAD^+ augmente le QO_2 , diminue la consommation de glutamate et diminue encore plus la quantité d'aspartate accumulée. C'est le cas rencontré avec des sarcosomes non lavés incubés en présence du piège hexokinase plus glucose. On constate dans ce cas là, comme nos résultats le montrent, que les rapports $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Glu}}$ et $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{Asp}}$ sont augmentés. Comme

la formation d'aspartate est fortement inhibée, bien plus que la diminution de la consommation de glutamate, le rapport $\frac{\Delta O}{\Delta Asp}$ augmente beaucoup plus que le rapport $\frac{\Delta O}{\Delta Glu}$. On doit en conclure que l'addition de NAD^+ stimule la déshydrogénase glutamique aux dépens de la transamination.

Une inhibition semblable de la transamination a rarement été mentionnée. KREBS (48) a signalé un résultat semblable avec des sarcosomes de muscle de pigeon mais ses incubations étaient effectuées sans addition de NAD^+ . Cet auteur attribuait, dans son cas, l'inhibition de la transamination à la perte de la transaminase glutamique aspartique (E.C. 2.6.1.1) au cours du lavage des sarcosomes. Cette explication n'est pas valable pour nous. D'une part, les sarcosomes ne sont pas lavés, et en absence de NAD^+ ajouté la transamination est voisine de 100 % ; d'autre part, après lavage des sarcosomes la transamination fonctionne à près de 100 %, avec et sans NAD^+ .

La remarque précédente attire l'attention sur les facteurs qui contrôlent l'inhibition de la transamination lorsque NAD^+ est ajouté dans le milieu d'incubation des sarcosomes. Le lavage des sarcosomes peut ainsi éliminer un substrat endogène capable de réagir avec l'oxalacétate, et court-circuiter ce dernier aux dépens de la transamination (73). Cela expliquerait d'ailleurs l'absence d'oxalacétate accumulé quelles que soient les conditions.

Il est impossible de ne pas penser aux désensibilisations des enzymes allostériques quand on voit que la transamination n'est plus inhibée en présence de NAD^+ après lavage des sarcosomes.

LA STIMULATION DE LA DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE PAR L'ADDITION DE NAD^+ .

Si l'addition de NAD^+ stimule la déshydrogénase glutamique au détriment de la transamination, on devrait trouver une quantité de NH_4^+ accumulée dans le milieu, et correspondant à la quantité de glutamate métabolisée par désamination oxydative. Or les quantités de NH_4^+ dosées sont inférieures à celles qu'on est en mesure d'attendre. Par ailleurs, même quand il y a de l'ATP disponible, on n'observe pas de synthèse de glutamine ni d'acide glutamique comme KUN (52) en a observé au niveau des mitochondries de rein. Une synthèse éventuelle d'alanine par transamination du glutamate avec le pyruvate n'est pas décelée non plus.

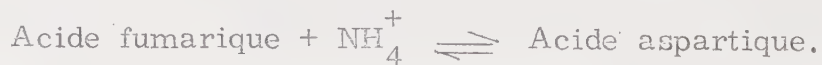
Il s'avère indispensable, pour mieux étudier la voie d'oxydation du glutamate par la déshydrogénase glutamique, d'interdire à ce substrat la possibilité de s'oxyder par transamination. Nous avons utilisé le malonate. L'addition de NAD^+ , en présence de cet inhibiteur augmente la quantité d'oxygène

consommé et la quantité de NH_4^+ accumulé, par rapport aux mêmes essais sans NAD^+ . La plupart des auteurs ont utilisé cet inhibiteur (36) (7), et ont publié depuis des résultats semblables aux nôtres en ce qui concerne les mitochondries de foie (35) (36) (63).

Le difluorooxalacétate inhibe complètement la transamination et ne laisse subsister qu'un faible QO_2 . NAD^+ ajouté, dans ces conditions, augmente ce QO_2 de 260 % en simulant la déshydrogénase glutamique et tous les enzymes du cycle de Krebs. Les effets obtenus avec le monofluorooxalacétate sont en faveur de l'activation de la déshydrogénase glutamique par NAD^+ . Ce dernier inhibiteur bloque la déshydrogénase malique et empêche la formation d'oxalacétate. Néanmoins cet inhibiteur de KUN (53) s'est révélé moins intéressant qu'on pouvait le penser à priori. Il peut, en effet, se transaminer (53). Pour prouver que la transamination du glutamate est liée à la production d'oxalacétate, il aurait donc fallu utiliser les deux inhibiteurs à la fois.

Si le milieu contient du glutamate dont l'oxydation est inhibée par le malonate, l'addition de fumarate en présence de NAD^+ rétablit le QO_2 mais augmente aussi la quantité d'aspartate par rapport aux essais glutamate seul et glutamate + fumarate. Ces résultats peuvent s'expliquer partiellement par l'action conjuguée du fumarate et du NAD^+ ajouté. Le fumarate rétablit la formation d'oxalacétate ; NAD^+ stimule la déshydrogénase glutamique et la déshydrogénase malique, augmentant encore la production d'oxalacétate.

Nous avons vérifié que l'on ne peut pas attribuer les effets du fumarate (QO_2 et formation accrue d'aspartate), en milieu glutamate, malonate et fumarate, à une réaction du type (L-aspartate ammonia-lyase, E.C. 4.3.1.1):



Cette réaction est d'ailleurs connue chez les microorganismes et les plantes, mais ne l'est pas chez les vertébrés.

Il faut insister enfin, sur les résultats obtenus avec l'oxygène pur. De tous les substrats oxydés par les sarcosomes de coeur, le glutamate est le seul qui soit aussi sensible à la tension d'oxygène ; la tension d'oxygène modifie peut-être la perméabilité de la mitochondrie vis à vis du glutamate. Il en résulte une augmentation des quantités de glutamate oxydées par l'une et l'autre voie.

LES PREUVES DIRECTES DU FONCTIONNEMENT DE LA DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE, SA SPECIFICITE, SA LOCALISATION.

La méthode de STRECKER n'est pas une bonne méthode

pour déterminer quantitativement le fonctionnement de la déshydrogénase glutamique. D'une part, NADH accumulé peut provenir des différentes déshydrogénases du cycle de KREBS, et d'autre part, l'état d'équilibre est très rapidement atteint, puisque $\text{NADH} + \text{H}^+$ ne peut pas être réoxydé par la chaîne respiratoire, inhibée par le cyanure.

Le dosage de NH_4^+ avancé comme une preuve catégorique par nombre d'auteurs (17) (18) (35)⁴ doit être apprécié avec beaucoup de prudence. Dans la plupart des cas, des dosages témoins très rigoureux doivent être effectués.

D'un côté, les quantités de NH_4^+ dosées peuvent être entachées d'erreurs provenant soit de la glutamine endogène dans le cas des sarcosomes non lavés, soit d'autres désaminases. Les essais, en présence de NADP^+ notamment, traduisent le fonctionnement de telles désaminases qui n'ont rien à voir avec celui de la déshydrogénase glutamique, dont la spécificité vis à vis de ce coenzyme est très faible (82). L'addition de NADP^+ à des mitochondries de foie donne aussi un résultat du même type.

D'un autre côté, les quantités de NH_4^+ dosées ne rendent pas compte du fonctionnement de la déshydrogénase glutamique. L'ammoniac est un poison. On peut penser qu'une réutilisation de ce substrat a lieu dans les sarcosomes. Notamment, en absence du piège hexokinase plus glucose, la disponibilité en énergie peut favoriser la réamination d'acides α -cétoniques. Par exemple, l'oxalacétate peut être réduit en aspartate en présence de NH_4^+ et NADH. Il n'est pas impossible non plus que des fonctions carboxyle appartenant à des protéines retiennent de l'ammoniac sous forme de sel non ionisé. Le blocage des réactions par l'acide trichloracétique est favorable à une telle réaction. Le sel d'ammonium se trouve ainsi rejeté avec le précipité.

La preuve d'une réutilisation de NH_4^+ est apportée par les essais effectués en présence d'arsénite. L'addition d'arsénite au milieu d'incubation des sarcosomes augmente la quantité de NH_4^+ dosée. On sait par ailleurs que l'inhibition de l'oxydation de l' α -cétoglutarate est de 100 % en présence d'arsénite. La consommation d'oxygène ne peut donc pas, dans ces conditions, provenir du fonctionnement d'un autre enzyme que la déshydrogénase glutamique. Nos résultats montrent cependant que $\frac{\Delta \text{O}}{\Delta \text{NH}_4^+} = 3,5$.

La quantité de NH_4^+ dosée représente environ 28 % de la quantité réelle. Il n'est pas exclu qu'en absence d'arsénite, ce pourcentage soit encore plus faible. Il n'est pas exclu non plus que l'ammoniac produit au cours du fonctionnement de la déshydrogénase glutamique soit compartimenté et soit réutilisé très rapidement. Cette compartimentation expliquerait que l'ammoniac provenant d'autres désaminases puisse s'accumuler en assez grosses

quantités, comme c'est le cas dans les essais effectués en présence de NADP^+ .

En tout état de cause, le dosage de NH_4^+ est une preuve de l'existence et du fonctionnement de la déshydrogénase glutamique quand on trouve autant d' α -cétooglutarate que de NH_4^+ . L' α -cétooglutarate ne s'accumule qu'en présence d'arsénite. Dans ces conditions, il est possible de déterminer le rapport $\frac{\Delta \text{NH}_4^+}{\Delta \alpha \text{KG}}$. Ce rapport est généralement toujours supérieur à 1,

$$\frac{\Delta \text{NH}_4^+}{\Delta \alpha \text{KG}}$$

même si l'on a pris soin de soustraire les quantités de NH_4^+ provenant de la respiration endogène. Il n'est pas impossible que la quantité d' α -cétooglutarate soit en fait inférieure à celle provenant de la désamination oxydative du glutamate. L'arsénite inhibe la réaction de décarboxylation de l'acide α -cétooglutarique en formant des liaisons de covalence entre les groupements $-\text{SH}$ de la dihydrolipoamide impliquée dans la série des réactions et l'arsenic. Cette réaction n'empêche pas une éventuelle décarboxylation d'une petite quantité d' α -cétooglutarate au contact de la thioamine pyrophosphate endogène des sarcosomes. Un argument en faveur d'une telle éventualité est d'ailleurs apporté par les résultats obtenus avec les mitochondries de foie. Dans ce dernier cas, il est possible de doser la quantité de glutamate consommée en présence d'arsénite et de NAD^+ . Pour 8,4 μmoles de glutamate consommé pendant l'heure et pour 10 mg. de protéines, il s'accumule 7,6 μmoles de NH_4^+ , et seulement 4,8 μmoles d' α -cétooglutarate. Des rapports

$\frac{\Delta \text{NH}_4^+}{\Delta \alpha \text{KG}}$ semblables, en présence d'arsénite, n'ont à notre connaissance, jamais été publiés.

Le mécanisme d'inhibition de l'oxydation de l' α -cétooglutarate par l'arsénite (d'autres liaisons $-\text{SH}$, et notamment au niveau de la chaîne respiratoire, peuvent être touchées) interdit de tirer des conclusions sur les éventuelles incidences du contexte mitochondrial sur le fonctionnement de la déshydrogénase glutamique.

Par exemple, en présence d'arsénite et NAD^+ dans le milieu d'incubation des sarcosomes, les quantités de NH_4^+ et α -cétooglutarate dosées, les consommations d'oxygène, sont identiques, que l'on soit en présence du piège hexokinase plus glucose ou en son absence.

En considérant les consommations de glutamate par les sarcosomes, avec ou sans piège, et en tenant compte des résultats obtenus en présence d'arsénite, on peut donner le pourcentage minimum de la quantité de glutamate oxydée par la déshydrogénase glutamique ; soit 5 % en présence du piège hexokinase plus glucose, 15 à 18 % en son absence.

Les résultats obtenus avec NADP^+ traduisent une non concordance entre les dosages de NH_4^+ et α -cétoglutarate. C'est la raison pour laquelle nous pensons que ce coenzyme n'est pas spécifique de l'enzyme. Nous sommes arrivés à une conclusion identique avec les mitochondries de foie. TAGER et coll. (63) (75), KLINGENBERG (47) pensent cependant que, in vivo, l'enzyme du foie fonctionnerait avec NADP^+ . L'accumulation de NADPH résultant de son fonctionnement, inhiberait selon ces auteurs, le fonctionnement de l'enzyme (NADPH n'est, en effet, par réoxydé directement par la chaîne respiratoire). Ces auteurs concluent, de ce fait, au fonctionnement très réduit de l'enzyme, dans les mitochondries de foie.

L'ensemble des résultats obtenus avec des sarcosomes lavés montre que la déshydrogénase glutamique n'est pas éliminée par ce traitement des particules. La localisation de cet enzyme au niveau des membranes mitochondriales a été confirmée par les travaux de A. YOUNES (82). Mais comme l'activité de la transaminase glutamique - aspartique est très élevée, dans ces conditions, même en présence de NAD^+ ajouté, l'activité de la déshydrogénase glutamique est faible. Incontestablement, l'élimination des facteurs endogènes des sarcosomes diminue les possibilités d'oxydation du glutamate par la déshydrogénase glutamique.

LE CONTROLE DU METABOLISME DU GLUTAMATE ; LE ROLE REGULATEUR DE LA DESHYDROGENASE GLUTAMIQUE.

On peut penser que l'oxydation du glutamate, au niveau des sarcosomes de coeur de Porc, est sous la dépendance d'un système multi-enzymatique dont le fonctionnement est contrôlé par le contexte physiologique. La teneur en déshydrogénase glutamique est relativement réduite dans les sarcosomes de coeur (64). Tous les faits soulignent que les informations provenant du milieu biologique vont agir sur cet enzyme soit dans le sens de la désamination oxydative du glutamate, soit dans le sens de la réduction de l' α -cétoglutarate.

La concentration physiologique du glutamate dans la cellule ($3 \text{ à } 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) et celle de NAD^+ sont en faveur du fonctionnement de l'enzyme dans le sens de l'oxydation du glutamate. La très faible concentration de l'aspartate (20 fois inférieure à celle du glutamate) incline, au contraire, à penser que la transamination du glutamate est surtout fonction de la disponibilité en oxalacétate, elle-même contrôlée par tout le métabolisme de la mitochondrie. La transaminase ne semble devoir fonctionner à 100 % que dans les cas de fortes demandes en aspartate.

Il faut signaler ici l'augmentation de la vitesse de désamination du glutamate quand la concentration de ce substrat diminue dans le milieu d'incubation. Nous avons observé ce fait en présence de malonate et de NAD^+ ajouté. HIRD

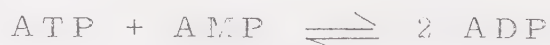
et coll. (35) (36) ont obtenu un résultat identique avec des mitochondries de foie, résultat d'ailleurs contesté par SLATER (18). L'ammoniac accumulé est un poison. Compte tenu du fait qu'il peut diffuser facilement de la mitochondrie dans le cytoplasme et participer à diverses réactions de synthèse, on peut penser qu'il n'est pas un inhibiteur du métabolisme mitochondrial. Il peut d'ailleurs éventuellement participer à une réaction de synthèse de glutamate à partir de l'acide α -cétooglutarique. Nos résultats montrent, en tous cas, que l'addition de NH_4^+ à des sarcosomes ne modifie pas le QO_2 du glutamate. KATUNUMA et NH_4^+ OKADA (43) (44) ont signalé une inhibition du cycle de KREBS par NH_4^+ dans les mitochondries de foie. L'inhibition interviendrait au stade de la transformation de l'isocitrate en oxalsuccinate.

La vitesse de réoxydation du $\text{NADH} + \text{H}^+$ formé au cours de la désamination oxydative du glutamate doit être appréciée en fonction des conditions.

En présence d'hexokinase plus glucose qui piège l'ATP formé au fur et à mesure de sa synthèse, les conditions sont la réplique, en ce qui concerne l'intensité des phosphorylations oxydatives, de ce qui se passe dans la cellule lorsqu'un fort besoin en ATP se fait sentir dans l'espace extramitochondrial.

Dans ces conditions, la déshydrogénase glutamique fournit, sans que la quantité de glutamate oxydé soit augmentée, un surplus d'ATP. Le seul facteur limitant est la capacité des enzymes de la chaîne respiratoire. Il ne suffit d'ailleurs pas que la vitesse des électrons soit très grande pour que la déshydrogénase glutamique fonctionne à plein. Le couplage de ce transfert des électrons à une synthèse d'ATP est absolument nécessaire. En effet, comme l'a montré A. YOUNES (82), si la vitesse des électrons est augmentée par l'addition d'un découplant comme le dinitrophénol, c'est surtout la transamination du glutamate qui est stimulée.

En absence du piège, les conditions sont beaucoup plus proches des conditions d'équilibre. Le rapport $\frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$ contrôle le métabolisme. Dans nos conditions, ce rapport est vraisemblablement faible. Il existe, en effet, dans les sarcosomes un enzyme, la myokinase (E.C.2.7.4.3), qui transforme l'ATP en ADP et ceci, d'autant plus que dans le milieu d'incubation est additionné de l'AMP.



L'oxalacétate, dans de telles conditions, peut éventuellement être métabolisé par des réactions exigeantes en énergie ("energy linked reactions"). Bien que la phosphopyruvate carboxykinase (E.C.4.1.1.32) ne soit pas connue au niveau des sarcosomes de coeur, d'autres résultats (37) nous ont apporté

la preuve d'une synthèse de phosphoénolpyruvate. De telles réactions diminuent d'autant l'utilisation de ce substrat par la transaminase.

Le fonctionnement de la déshydrogénase glutamique dans le sens de la réduction de l'acide α -cétoglutarique a été prouvé par HO CHONG HONG (37) au niveau des sarcosomes de coeur de Porc. Ce fonctionnement est contrôlé par celui de la chaîne respiratoire, qui conditionne le rapport $\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}^+}$ (10 et 76). Dans le contexte physiologique, une forte concentration en ATP peut induire, par remontée des électrons dans la chaîne respiratoire, une augmentation du rapport $\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}^+}$ et indirectement favori-

ser la synthèse de glutamate. La compartimentation de NADH provenant du fonctionnement des déshydrogénases du cycle de KREBS peut aussi faciliter directement, dans certains cas, la réduction de l'acide α -cétoglutarique.

En fin de compte, la déshydrogénase glutamique est un enzyme en état de latence (2) (13) intervenant essentiellement pour régulariser le métabolisme mitochondrial. Un exemple de ce rôle régulateur peut être entrevu à propos de la sortie du pouvoir réducteur de la mitochondrie. KREBS (49) admet, à l'heure actuelle, que le passage du pouvoir réducteur de la mitochondrie dans le cytoplasme s'effectue par l'intermédiaire du malate. Le malate diffuserait facilement et s'oxyderait en oxalacétate par la déshydrogénase malique du cytoplasme (E.C.1.1.1.37) dont le coenzyme est NAD⁺. Le NADH formé se trouve ainsi disponible pour une réaction de synthèse. La synthèse du malate ne peut provenir, dans la mitochondrie, que de la réduction de l'oxalacétate ou de l'oxydation de l' α -cétoglutarate. Dans les deux cas, la mitochondrie ne peut maintenir son état d'équilibre énergétique, qu'en compensant l'inhibition de la transamination, résultant de la sortie du malate, par une stimulation de la déshydrogénase glutamique. Une synthèse d'acides gras peut d'ailleurs s'effectuer dans les sarcosomes (38) et court-circuiter NADH à un niveau quelconque du cycle de KREBS. Le système de régulation précédent peut alors jouer de façon identique. Il faut rappeler ici l'extraordinaire sensibilité aux effecteurs allostériques de la déshydrogénase glutamique isolée à partir du foie de bœuf (3) (6) (19) (22) (23) (24) (34) (51) (58) (77). Seul l'isolement de l'enzyme des sarcosomes du coeur permettra de dire si cette protéine est tout aussi réceptive aux signaux provenant du contexte physiologique, et de déterminer ces signaux.

On peut même se demander si cet enzyme n'interviendrait pas à un stade ou à un autre, dans le mécanisme d'action des hormones régularisant le battement cardiaque.

En conclusion générale, notre travail montre que, contrairement à ce qu'on avait pensé au préalable (7) la déshydrogénase glutamique peut jouer un rôle non négligeable dans le métabolisme du glutamate au niveau des sarcosomès de coeur. Un résultat semblable, postérieur au nôtre, a été montré par E. KUN (52). L'enzyme est spécifique de NAD^+ et n'est pas décroché par lavage des sarcosomes. Sa grande aptitude à répondre au contexte métabolique, et sa faible concentration, inclinent à conclure que cet enzyme a un rôle régulateur. Son activation semble étroitement liée à l'inhibition de la transamination.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARCOS, J.C., WALDER, J.A et ARGUS, M.F. - Nature, 1964, 201, 398.
2. BALAZS, R. - Biochem. J., 1965, 95, 497.
3. BAYLEY, P.M. et RADDA, G.K. - Biochem. J., 1965, 98, 105.
4. BERENBLUM, J. et CHAIN, E. - Biochem. J., 1938, 32, 295.
5. BERGER, L., STEIN, N.M., COLOWICK, S.P. et CORI, C.F. - J. Gen. of Physiol., 1946, 29, 379.
6. BITENSKY, M.W., YIELDING, K.L. et TOMKINS, G.M. - J. Biol. Chem., 1965, 240, 1077.
7. BORST, P. - Biochem. Biophys. Acta, 1962, 57, 256.
8. BORST, P. et SLATER, E.C. - Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, 170.
9. BUCHER, C.S. - Z. Naturforschg, 1953, 86, 555.
10. CHANCE, B. - J. Biol. Chem., 1961, 236, 1544.
11. CHANCE, B. et WILLIAMS, G.R. - Advances in Enzymology, 1956, 17, 65.
12. CHANCE, B. et MELA, L. - Proc. Natl. Acad. Sci., 1966, 55, 1243.
13. CHAPPELL, J.B. - Biochem. J., 1964, 90, 237.
14. CHARLES, R., TAGER, J.M. et SLATER, E.C. - Biochim. Biophys. Acta, 1967, 131, 29.
15. CRANE, F.L., GLEEN, J.F. et GREEN, D.E. - Biochim. Biophys. Acta, 1956, 22, 476.
16. COHEN, P.P., SALLACH, H.J. et GREENBERG, D.M., dans Metabolic Pathways, ed. by GREENBERG, D.M., Vol. II, Academic Press, N.Y., 1961, p. 37 et 83.
17. DE HAAN, E.J., TAGER, J.M. et SLATER, E.C. - Biochim. Biophys. Acta, 1964, 89, 375.
18. DE HAAN, E.J., TAGER, J.M. et SLATER, E.C. - Biochim. Biophys. Acta, 1967, 131, 1.
19. FAHIEN, L.A., WIGGERT, B.O. et COHEN, P.P. - J. Biol. Chem., 1965, 240, 1083.
20. FISHER, H.F. et Mc GREGOR, L. - J. Biol. Chem., 1960, 235, 1830.
21. FISKE, C.H. et SUBBAROW, Y. - J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.
22. FRIEDEN, C. - Biochem. Biophys. Res. Com., 1963, 10, 410.
23. FRIEDEN, C. - J. Biol. Chem., 1963, 238, 3286.
24. FRIEDEN, C. - J. Biol. Chem., 1965, 240, 2028.
25. GAUTHERON, D. et GAUDEMER, Y. - Congrès International de Moscou, 1961, et C.R. Acad. Sci, 1962, 255, 200.
26. GAUTHERON, D. et GAUDEMER, Y. - Résultats non publiés.
27. GLOCK, E.G. et Mc LEAN, P. - Biochem. J., 1955, 61, 388.
28. GODINOT, C. - Thèse de Doctorat de Spécialité, 1967, Lyon.
29. GOEBELL, H. et KLINGENBERG, M. - Biochim. Biophys. Res. Com., 1963, 13, 209 et 213.

30. GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. et DAVID, N.M. - *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, 751.
31. GREENSPAN, M. et PURVIS, J.L. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 99, 191.
32. GUTFREUND, H., EBNER, K.E. et MENDOLA, L. - *Nature*, 1961, 192, 821.
33. HASLAM, R.J. et KREBS, H.A. - *Biochem. J.*, 1963, 88, 566.
34. HERSHKO, A. et KINDLER, S.H. - *Biochem. J.*, 1966, 101, 661.
35. HIRD, F.J.R. et MARGINSON, M.A. - *Nature*, 1964, 201, 1224.
36. HIRD, F.J.R. et MORTON, D.J. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 85, 353.
37. HO CHONG HONG - Thèse d'Université, 1967, Lyon.
38. HULSMANN, V.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 58, 417.
39. HUNTER, F.E., MALISON, R., BRIDGERS, W.F., SCHÜTZ, B. et ATCHINSON, A. - *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 693.
40. I.U.P.A.C. - I.U.B. - *Biochem. J.*, 1966, 101, 1.
41. JACOBSON, B. et KAPLAN, N.O. - *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 603.
42. JONES, E.A. et GUTFREUND, H. - *Biochem. J.*, 1961, 79, 608.
43. KATUNUMA, N. et OKADA, M. - *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1963, 12, 252.
44. KATUNUMA, N. et OKADA, M. - *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1965, 19, 108.
45. KIELLEY, R. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 21, 574.
46. KIRSTEN, E., GEREZ, C. et KIRSTEN, R. - *Biochemische Zeitschrift*, 1963, 337, 312.
47. KLINGENBERG, M. et PETTE, D. - *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1962, 7, 430.
48. KREBS, H.A. et BELLAMY, D. - *Biochem. J.*, 1960, 75, 523.
49. KREBS, H.A., GASCOYNE, T. et NORTON, B.M. - *Biochem. J.*, 1967, 102, 275.
50. KREBS, H.A. et HEMS, R. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, 12, 172.
51. KUN, E. et ACMATOWICZ, B. - *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 2619.
52. KUN, E., AYLING, E. et BALTIMORE, B.G., *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 2896.
53. KUN, E., GOTTWALD, L.K., FANSHIER, D.W. et AYLING, J.E. - *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 1457.
54. LEHNINGER, A.L. - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, XLVI, 1955.
55. LEHNINGER, A.L., dans *The Mitochondrion*, W.A. Benjamin Inc., 1965, p. 61.
56. LESTER, R.L., HATEFI, Y. et WELCH, E. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, 29, 103.

57. Mac LENNAN, D.H. et TZAGOLOFF, A. - J. Biol. Chem., 1966, 241, 1933.
58. MAGAR, M.E. - Biochim. Biophys. Acta, 1965, 96, 345.
59. MONOD, J., CHANGEUX, J.P. et JACOB, F. - J. Molec. Biol., 1963, 6, 306.
60. MULLER, A.F. et LEUTHARDT, F., Helv. Chim. Acta, 1950, 33, 268.
61. OCHOA, S., dans Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., 1955, vol. I, p. 735.
62. PAPA, S., SACCONI, C., PALMIERI, F., FRANCAVILLA, A. et QUAGLIARIELLO, E. - Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1963, 29, 617.
63. PAPA, S., TAGER J.M., FRANCAVILLA, A., DE HAAN, E.J. et QUAGLIARIELLO, E. - Biochim. Biophys. Acta, 1967, 131, 14.
64. PETTE, D., dans Regulation of metabolic Processes in mitochondria, ed. by TAGER, J.M., PAPA, S., QUAGLIARIELLO, E. et SLATER, E.C., BBA Library, 1966, vol. 7, p. 28.
65. PURVIS, J.L. - Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 435.
66. PURVIS, J.L. et LOWENSTEIN, J.M. - J. Biol. Chem., 1961, 236, 2794.
67. QUAGLIARIELLO, E., PAPA, S., SACCONI, C., PALMIERI, F. et FRANCAVILLA, A. - Biochem. J., 1965, 95, 742.
68. RACKER, E., dans mechanisms in Bioenergetics, Academic Press, N.Y., 1965, p. 7.
69. SHRAGO, E. et LARDY H.A. - J. Biol. Chem., 1966, 241, 663.
70. SLATER, E.C. - Biochem. J., 1953, 53, 52.
71. SLATER, E.C., BAILLIE, M.J. et BONNAN, J. dans Biological Structure and Function, Academic Press, N.Y., 1961, vol. II, p. 210.
72. SLATER, E.C. et CLELAND, K.W. - Biochem. J., 1953, 53, 547.
73. STERN, J.R., SHAPIRO, B., STADTMAN, E.R. et OCHOA, S. - J. Biol. Chem., 1951, 193, 703.
74. STRECKER, H.J., dans Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., 1955, vol. II, p. 220.
75. TAGER, J.M. et PAPA, S. - Biochim. Biophys. Acta, 1965, 99, 570.
76. TAGER, J.M. et SLATER, E.C. - Biochim. Biophys. Acta, 1963, 77, 246.
77. TOMKINS, G.M., YIELDING, K.L., CURRAN, J.F., SUMMERS, M.R., et BITENSKY, M.V., J. Biol. Chem., 1965, 240, 3793.
78. VIGNAIS, P.V. et DUEE, E.D. - Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 1169.
79. WALTER, P. PAETKAU, W. et LARDY, H.A., J. Biol. Chem., 1966, 241, 2523.
80. WEICHSELBAUM, T.A. - Am. J. clin. Path., Tech. suppl., 1946, 10, 40.
81. WEINBACH, E.C., Anal. Biochem., 1961, 2, 335.
82. YOUNES, A. - Thèse de Doctorat de Spécialité, 1967, Lyon.

TABLE DES MATIERES

	Pages
- Introduction	3
- Rappel théorique	6
- Liste des abréviations utilisées	15
- Chapitre I - Matériel et techniques	16
A - Produits	16
B - Animaux	17
C - Techniques	18
1) Méthode de préparation et isolement des suspensions mitochondriales	18
2) Méthodes de dosage et d'analyse	19
- Chapitre II - L'oxydation du glutamate : influence de différents facteurs et inhibiteurs	37
A - Influence de NAD^+ et NADP^+ ajoutés, de l'atmosphère (Air et O_2), du fumarate et du piège hexokinase plus glucose	37
1) Oxydation du glutamate en milieu Kielley sans NAD^+ ou en milieu pauvre en NAD	37
2) Influence de NAD^+ ajouté sur le QO_2 du glutamate et son inhibition par le malonate - Influence de l'oxygène pur comparée à celle de l'air.	38
3) Influence de NAD^+ sur la consommation de glutamate et la formation d'aspartate, en atmosphère Air et O_2 pur	38
4) Influence comparée de NAD^+ et NADP^+ ajoutés sur le QO_2 du glutamate et son inhibition par le malonate, et sur la consommation du glutamate et la formation d'aspartate. Effets de l'addition du piège hexokinase plus glucose.	43
5) Influence du fumarate sur l'inhibition de l'oxydation du glutamate par le malonate.	47
B - Influence de l'arsénite et des inhibiteurs de KUN sur le métabolisme du glutamate.	52
1) Influence de l'arsénite	54

2) Influence des inhibiteurs de KUN	54
- Chapitre III - Mise en évidence directe du fonctionnement de la déshydrogénase glutamique et étude de l'influence des facteurs endogènes sur le métabolisme du glutamate	61
A - La déshydrogénase glutamique	61
1) Détermination de $\text{NADH} + \text{H}^+$ par la méthode de STRECKER	61
2) Détermination de NH_4^+	62
B - La respiration endogène des sarcosomes et l'influence du lavage des sarcosomes sur le métabolisme du glutamate.	66
1) La respiration endogène des sarcosomes	66
2) La respiration endogène après lavage des sarcosomes	70
3) Influence du lavage des sarcosomes sur l'oxydation du glutamate et son inhibition par le malonate et l'arsénite	73
4) Influence du lavage des sarcosomes sur l'accumulation de NH_4^+	73
5) Influence du lavage des sarcosomes sur le métabolisme du glutamate et l'accumulation de NH_4^+ , en absence du piège hexokinase plus glucose.	73
- Chapitre IV - Bilans de l'oxydation du glutamate.	79
1) Influence de concentrations variables de glutamate ajouté sur le métabolisme de ce substrat	79
2) Test d'activité déshydrogénase glutamique des divers échantillons d'hexokinase utilisés	79
3) Bilans de l'oxydation du glutamate par des sarcosomes lavés et non lavés, en présence du piège hexokinase plus glucose.	82
4) Bilans de l'oxydation du glutamate par des sarcosomes lavés et non lavés, en absence du piège hexokinase plus glucose	90
5) Bilan de l'oxydation du glutamate par des mitochondries de foie de Rat, incubées en présence du piège hexokinase plus glucose.	93
- Résumé - Conclusions	97
- Discussion	102
- Bibliographie	114
- Table des Matières	117

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

LES REACTIONS RECUPERATRICES D'ENERGIE AU NIVEAU
DE LA CHAINE RESPIRATOIRE

Vu :

Les membres du Jury

J. CHOPIN

D. GAUTHERON

L. COLOBERT

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences

J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

LYON le 20 Mai 1967

Le Recteur,

Président du Conseil de L'Université

P. LOUIS

